
TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Studijní program: N2612 – Elektrotechnika a informatika
Studijní obor: 1802T007 – Informační technologie

**Využití moderních metod pro hodnocení vývoje
bakteriálního biofilmu na nanovlákně textilii**

**The use of modern methods for evaluating
of bacterial biofilm development on nanofiber
textile**

Diplomová Práce

Autor:	Bc. Tomáš Dub
Vedoucí práce:	Ing. Lucie Křiklavová
Konzultant:	Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

V Liberci 18. 05. 2012

Technická univerzita v Liberci
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových
Akademický rok: 2010/2011

Studijní program: Elektrotechnika a informatika
Forma: Prezenční
Obor/komb.: Informační technologie (IT)

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

PŘEDKLÁDÁ:	ADRESA	OSOBNÍ ČÍSLO
Bc. DUB Tomáš	Na Výsluní 992, Nové Město pod Smrkem	M09000211

TÉMA ČESKY:

Využití moderních metod pro hodnocení vývoje bakteriálního biofilmu na nanovlákněné textilií

NÁZEV ANGLICKY:

The use of modern methods for evaluating of bacterial biofilm development on nanofiber textile

VEDOUcí PRÁCE:

Ing. Lucie Kříklavová

ZÁSADY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1. Zpracování odborné rešerše pro oblasti moderních metod hodnocení biofilmu a nanovlákněné technologie a jejich využití při čištění odpadních vod.
2. Přehled moderních metod hodnocení bakteriálního biofilmu a jejich praktické využití.
3. Provoz laboratorního modelu biofilmového reaktoru s nanovlákněnou textilií.
4. Sledování vývoje biofilmu moderními metodami ve srovnání s běžnými postupy.
5. Identifikace limitních stavů biofilmového reaktoru a selekce nejvhodnější nanovlákněné textilie jako nosiče bakteriální populace.

SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY:

- [1] HLAVÁČ, Václav; ŠONKA, Milan. Počítačové vidění. Praha : Grada, 1992. 250 s. ISBN 80-85424-67-3.
- [2] WU, Qiang ; MERCHANT, Fatima; CASTLEMAN, Kenneth. Microscope image processing. Academic Press, 2008. 548 s. ISBN 978-0-12-372578-3.
- [3] Základní metody světelné mikroskopie. Brno : Optoteam, s.r.o., Nikon, 2004. 66 s.
- [4] LEWANDOWSKI, Zbigniew; BEYENAL, Haluk. Fundamentals of biofilm research. CRC Press, 2007. 452 s. ISBN 9780849335419.
- [5] O'GORMAN, Lawrence; SAMMON, Michael; SEUL, Michael. Practical Algorithms for Image Analysis : Description, Examples, Programs, and Projects. Cambridge University Press, 2008. 349 s. ISBN 9780521884112.

Konzultant: Ing. Tomáš Lederer, Ph.D., Odborný asistent s vědeckou hodností, TUL Liberec, FM NTI

Rozsah práce: 40 - 60 stran, grafické práce dle potřeby dokumentace

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum

Podpis

Poděkování

Nejprve bych chtěl poděkovat Ing. Lucii Křiklavové za podnětné rady, poskytnuté vědomosti a příkladné odborné vedení po celou dobu práce. Dále bych chtěl poděkovat Tomáši Ledererovi, Ph.D. za odborné a věcné připomínky zejména při dokončování této práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat všem zaměstnancům a studentům, se kterými jsem se setkal v Laboratoři sanačních technologií ústavu NTI TUL, za vřelé přijetí a příjemné pracovní prostředí. Závěrem děkuji svým rodičům za podporu při mých studiích.

Abstrakt

Práce se zabývá biologickým čištěním odpadních vod a moderními metodami hodnocení bakteriálního biofilmu. První část práce pojednává o dlouhodobých laboratorních experimentech pro čištění odpadních vod s vysokým obsahem fenolů, kresolů a dimethylfenolů. V laboratorních experimentech byla užitá podzemní voda z areálu bývalé výroby fenolů. Experimenty byly provozovány jako kontinuální průtočné bioreaktory se dvěma typy nosičů biomasy (pro fixaci mikroorganismů na jejich povrchu). Reaktory byly inokulovány bakteriemi rodu *Rhodococcus erythropolis*, které byly předem adaptovány na dané znečištění na VŠCHT Praha. V prvním případě byl zvolen reaktor s fluidním ložem a komerčním nosičem AnoxKaldnes. Ve druhém reaktor s fixním ložem, v němž byl užit nanovláknový nosič vyvíjený na Technické univerzitě v Liberci. Kontinuální provoz obou reaktorů byl pravidelně sledován, tudíž bylo následně možné zhodnotit účinnost degradace fenolických látek, nalézt limitní stavy reaktorů a porovnat účinnost reaktorů a užitých typů nosičů (komerční AnoxKaldnes a nanovláknový).

Druhá část práce se zabývá sledováním vývoje biofilmu na daném nosiči metodami běžnými a také mikroskopickým snímáním doplněným o obrazovou analýzu. Přednostmi obrazové analýzy jsou její rychlost, objektivní hodnocení, efektivita při zpracování velkého množství dat a také nevyžaduje žádnou větší zkušenost s analytickým postupem. Z hlediska biologické praxe je výhodou neinvazivní charakter obrazové analýzy, vzorek není nutné jakkoli poškozovat či barvit, tudíž je umožněno opětovné využití vzorku. V obrazové analýze biofilmu bylo snahou definovat co nejjednodušší postup stanovení především plošného zaplnění (míry kolonizace nosiče) biofilmem. Vzniklá metoda umožnila odhad bakteriální populace na daných typech nosičů z kontinuálního provozu reaktorů a určení kinetiky růstu biofilmu na nich. Výsledky obrazového hodnocení poskytly možnost porovnání komerčního nosiče s nanovláknovým a výběr nejvhodnějšího typu nanovláknového nosiče, neboť byly užity nosiče s odlišným nánosem nanovláknů.

Klíčová slova: biodegradace, nosiče biomasy, nanovláknová technologie, obrazová analýza, neinvazivní metoda

Abstract

This thesis deals with biological cleaning of wastewaters and modern methods for evaluating of bacterial biofilm. The first part of the thesis covers long-term laboratory experiments for cleaning of wastewaters with high content of phenols, cresols, and dimethylphenols. For the laboratory experiments was used ground water from an area of former phenol production. Experiments were operated as continual flow rate bioreactors with two different carriers of biomass (for fixation of microorganisms on their surface). Reactors were inoculated with bacterium of *Rhodococcus erythropolis* species, which were in advance adapted for the given kind of contamination on VŠCHT Praha. In the first case, it was chosen the fluidized bed reactor with commercial carrier AnoxKaldnes. In the second, it was used fixed bed reactor with nanofiber carrier which was developed on TUL Liberec. Continual operation of both reactors was periodically observed, so thus we were able to evaluate the rate of degradation of phenol substances and find limit conditions of reactors, compare effectiveness of both reactors and used types of carriers (commercial carrier AnoxKaldnes, and nanofiber carrier).

Second part deals with the observation of biofilm development on a chosen carrier. Observation is done by common methods and microscopy, which is supplemented by image analysis. Image analysis is quick, provides objective evaluation, it is effective during handling huge amount of dates, and additionally it does not require knowledge of analytical methods. The advantage of an image analysis is its non-invasive character; it does not need to damage or dye the sample. The sample can be reused. There was made an effort to define the simplest process of determination of a biofilm area cover (which represents the rate of colonization of carrier) in the image analysis. The method hereby developed was used for the estimation of bacterial population on the given carriers from the continual operation of reactors. The method was also used for determining the biofilm grow rate. From the results of image analysis, we were able to compare used types of carriers and furthermore determine the best nanofiber carrier, because there were used carriers with various layers of nanofiber.

Keywords: biodegradation, biomass carriers, nanofiber technology, image analysis, non-invasive method

Obsah

Prohlášení.....	3
Poděkování.....	4
Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Obsah	7
Seznam nejpoužívanějších symbolů, zkratek a termínů	9
Seznam tabulek	9
Seznam obrázků.....	9
1 Úvod.....	11
Teoretická část	13
2 Biofilm	13
2.1 Vznik biofilmu	13
2.1.1 Struktura biofilmu.....	13
2.1.2 Komunikace v biofilmu	14
3 Biologické čištění odpadních vod.....	15
3.1 Aktivace	15
3.1.1 Biofilmové reaktory	16
3.2 Odpadní vody.....	17
3.3 Organické látky v odpadních vodách.....	17
3.4 Fenol v odpadních vodách	18
3.5 Biodegradace, bakteriální růst	18
4 Metody obrazového hodnocení biofilmu	20
4.1 Vyhodnocování struktury biofilmu.....	20
4.2 Typy snímků	21
4.3 Hodnocení parametrů struktury	21
4.4 Prahování snímků biofilmu.....	22
4.5 Texturní parametry	22
4.6 Plošné parametry.....	25
4.6.1 Plošná porozita.....	25
4.6.2 Délka běhu	26
4.6.3 Difuzní vzdálenost	26
4.6.4 Hranice.....	27
4.6.5 Fraktální dimenze	28
4.7 Barevný prostor CIE L*a*b	29
4.8 K-Means Clustering.....	30
Praktická část – materiály a metody.....	32
5 Odpadní vody v laboratorních experimentech.....	32
6 Nosiče biofilmu.....	32
6.1 AnoxKaldnes MBBR.....	32
6.2 Nanovláknenné nosiče	33
6.3 Nosiče v laboratorních experimentech	34
7 Výběr mikroorganismů	34
7.1 Rhodococcus erythropolis.....	34
7.1.1 Inokulace biofilmových reaktorů.....	34
8 Laboratorní model.....	35
9 Užité metody měření.....	36
9.1 Stanovení CHSK.....	36

9.2	Optická denzita	36
9.3	Stanovení sušiny	37
9.4	pH.....	37
9.5	Konduktivita, vodivost.....	37
10	Snímkování biofilmu	38
10.1	Mikroskop Olympus BX51M	38
10.2	Fotoaparát Olympus E-510	38
10.3	QuickPHOTO MICRO 2.3	39
10.4	Deep Focus 3.1	39
	Praktická část – výsledky a jejich diskuze.....	40
11	Reálná degradace látek v odpadní vodě.....	40
11.1	Provoz modelů	40
11.2	Doba zdržení	41
11.3	Objemové zatížení	41
11.4	CHSK.....	42
11.5	Kyslík a respirace.....	44
11.5.1	Vyhodnocení laboratorních respiračních testů	45
11.6	Optická denzita	47
11.6.1	Stanovení sušiny	48
11.7	pH.....	48
11.8	Konduktivita, vodivost.....	49
11.9	Proces těkání	50
12	Obrazová analýza biofilmu	51
12.1	Snímkování	51
12.2	Obrazové hodnocení biofilmu	51
12.3	Princip starého obrazového hodnocení	52
12.4	Princip nového obrazového hodnocení.....	54
12.5	Popis nového obrazového hodnocení	55
12.6	Obrazové hodnocení 2D parametrů	59
12.7	Výsledky obrazového hodnocení.....	60
12.8	Výsledky obrazového hodnocení 2D parametrů.....	62
12.8.1	Počet objektů.....	62
12.8.2	Plošná porozita.....	63
12.8.3	Difuzní vzdálenost	64
12.8.4	Obsah	65
12.8.5	Běhové délky	67
	Závěr	69
	Literatura.....	72
	Přílohy.....	77

Seznam nejpoužívanějších symbolů, zkratek a termínů

AOX	...	halogenované organické sloučeniny
Inhibitor	...	látko zpomalující, nebo zastavující reakci
NL	...	nerozpuštěné látky
CHSK	...	chemická spotřeba kyslíku
GLCM	...	Gray level co-occurrence matrix
ADD	...	average diffusion distance (průměrná difuzní vzdálenost)
MDD	...	maximal diffusion distance (maximální difuzní vzdálenost)
HRL	...	horizontal run length (horizontální délka běhu)
VRL	...	vertical run length (vertikální délka běhu)
CIE	...	Commission internationale de l'éclairage (Mezinárodní komise pro osvětlování)
CIE L*a*b, Lab	...	barevný model, nezávislý na zařízení
K-Means	...	iterativní shlukovací algoritmus
ČOV	...	čistírna odpadních vod
MBBR	...	Moving Bed Biofilm Reactor
HDPE	...	High-density polyethylene
dtex	...	decitex, jednotka jemnosti chemických textilních vláken, představuje 1 gram hmotnosti na 10 kilometrů délky vlákna
COD	...	Chemical oxygen demand (CHSK, chemická spotřeba kyslíku)
UIS	...	Universal Infinity System (Univerzální soustava s mezizobrazením v nekonečnu)

Seznam tabulek

Tab. 11.1 Hodnoty sušiny (113. den provozu)	45
Tab. 11.2 Vypočtené respirační rychlosti (113. den provozu).....	46

Seznam obrázků

Obr. 4.1 Snímek biofilmu původní, ve škále šedé a binární	21
Obr. 4.2 Vstupní snímek pro matici prostorové závislosti [15].....	23
Obr. 4.3 Matice horizontální prostorové závislosti [15]	24
Obr. 4.4 Vertikální matice prostorové závislosti [15]	24
Obr. 4.5 Matice prostorové závislosti [15]	24
Obr. 4.6 Normalizace matice prostorové závislosti [15]	24
Obr. 4.7 Snímek pro výpočet plošné porozity [4][15]	25
Obr. 4.8 Délka běhu [15]	26
Obr. 4.9 Diagram shluku buněk (Difuzní vzdálenost (DD), horizontální délka běhu	27
Obr. 4.10 Hranice [4].....	27
Obr. 4.11 Dilatace pomocí dilatačních kruhů různých průměrů [15]	28
Obr. 4.12 Osy barevného prostoru L*a*b [34]	29
Obr. 4.13 Osy barevného prostoru L*a*b (2) [36]	30
Obr. 6.1 Komerční nosič AnoxKaldnes typ K3	32
Obr. 6.2 a) Různý způsob fixace nanovrstev (starý a nový), b) Detail nanovláken na nosiči c) Mechanismus ukotvení nití do pevného rámu.	33

Obr. 8.1 Sestavení laboratorního modelu	35
Obr. 10.1 Mikroskop Olympus BX51M [41]	38
Obr. 11.1 Vstupní parametry reaktorů	42
Obr. 11.2 Výstupní CHSK reaktorů	43
Obr. 11.3 Výstupní parametry reaktoru s AnoxKaldnes	43
Obr. 11.4 Výstupní parametry reaktoru s nanovláknem	44
Obr. 11.5 Respirometrická cela – komerční a nanovláknenné nosiče	45
Obr. 11.6 Absorbance reaktorů	47
Obr. 11.7 Trend nárůstu biomasy na nosiči	48
Obr. 11.8 Znázornění vývoje pH	49
Obr. 11.9 Vývoj trendu vodivosti	49
Obr. 11.10 Proces těkání kontaminantů z reálné odpadní vody	50
Obr. 12.1 Kalibrace snímků škály barev [48]	53
Obr. 12.2 Rozmezí matice a vyhodnocovaná oblast [48]	53
Obr. 12.3 Vyhodnocované rozmezí biofilmu [48]	53
Obr. 12.4 Srovnávací list zaplnění biofilmem [48]	54
Obr. 12.5 Snímek nosiče s biofilmem – vstupní snímek	55
Obr. 12.6 Segmentace vstupního snímku do tří barev	56
Obr. 12.7 Segmentace snímku s biofilmem na světlý, střední a tmavý	57
Obr. 12.8 Segmentace snímku s biofilmem na světlý, střední a tmavý (snímky převedeny do černobílé pro lepší přehlednost)	57
Obr. 12.9 Vizualizace pro výpočet pozadí	58
Obr. 12.10 Vyjádření objemového efektu a označení koeficientů tloušťky [40]	58
Obr. 12.11 a) Obraz původního nosiče s biofilmem b) Detekovaný biofilm, kde „red” = „světlý biofilm”, „green” = „střední biofilm”, „blue” = „tmavý biofilm”	59
Obr. 12.12 Časový průběh nárůstu biofilmu	60
Obr. 12.13 Korelace mezi parametry sušiny a plošného zaplnění biofilmem	61
Obr. 12.14 Kinetika růstu mikroorganismů na nosičích	62
Obr. 12.15 Počet objektů na nanovláknenném nosiči	62
Obr. 12.16 Počet objektů na nosiči AnoxKaldnes	63
Obr. 12.17 Plošná porozita nosičů	64
Obr. 12.18 Maximální difuzní vzdálenost	64
Obr. 12.19 Obsah biofilmu na nanovláknenném nosiči (3D hodnocení bez přepočtových koeficientů)	65
Obr. 12.20 Obsah biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (3D hodnocení bez přepočtových koeficientů)	66
Obr. 12.21 Obsah biofilmu na nanovláknenném nosiči (3D hodnocení s přepočtovými koeficienty)	66
Obr. 12.22 Obsah biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (3D hodnocení s přepočtovými koeficienty)	67
Obr. 12.23 Běhové délky objektů na nanovláknenném nosiči	67
Obr. 12.24 Běhové délky objektů na nosiči AnoxKaldnes	68

1 Úvod

Nanotechnologie jsou jedním z nejperspektivnějších odvětví v 21. století. Během posledních let jsou do jejich rozvoje investovány stále větší finance a jejich užití proniká do stále většího množství vědních a průmyslových odvětví. Užití nanotechnologií se rozšiřuje také v biologickém čištění odpadních vod, kde se pro čištění odpadních vod využívá biodegradačních procesů. Mikroorganismy jsou aplikovány ve formě suspenze, nebo nárostu (biofilm). Pro fixaci mikroorganismů se užívá speciálních nosičů. Dříve byly nosiče ve formě vestaveb do reaktorů, nyní se užívají vhodnější druhy nosičů – např. fluidní, nosič AnoxKaldnes. V posledních letech je na TUL snahou vyvíjet nosiče za pomoci nanotechnologie, konkrétně nitě s nánosem nanovláken. Takové nosiče mají velký měrný povrch, umožňují volnou cirkulaci vody a mají nespornou výhodu v rychlé kolonizaci a kultivaci mikroorganismy.

Biofilm poskytuje mikroorganismům ochranné prostředí, na rozdíl od mikroorganismů volně dispergovaných v reaktoru, tím zvyšuje jejich odolnost na chemické toxické znečišťující látky obsažené v odpadní vodě.

Pro analýzu biofilmu se běžně užívají metody invazivní, dochází při nich k destrukci biofilmu a/nebo destrukci samotného nosiče. Nejnovějším trendem v analýze biofilmu je užití neinvazivních metod – obrazové analýzy mikroskopických snímků. Výhodami obrazové analýzy jsou rychlost, objektivní hodnocení, efektivita při zpracování velkého množství dat, není nutná znalost postupů invazivních metod a poslední nespornou výhodou je, že neničí biofilm ani nosič.

Teoretická část práce se zabývá biofilmem, biologickým čištěním odpadních vod (se zaměřením na biofilmové reaktory) a moderními metodami hodnocení bakteriálního biofilmu, konkrétně obrazovou analýzou.

Druhá část práce popisuje materiály a metody použité v laboratorních experimentech pro biologickou degradaci fenolových odpadních vod – odpadní vody, nosiče biofilmu a zvolenou bakteriální populaci, sestavení laboratorních experimentů, metody sledování jejich charakteristik, prostředky použité pro mikroskopické snímání nosičů v průběhu jejich kolonizace v provozovaných biofilmových reaktorech.

Poslední část práce je rozdělena na dva oddíly. První popisuje reálnou degradaci látek v odpadní vodě, je zaměřena na podmínky provozu a hodnocení sledovaných charakteristik experimentů. Druhým oddílem je část zabývající se užitím obrazové

analýzy pro hodnocení bakteriálního biofilmu. Nejprve je popsán předchozí způsob hodnocení pomocí obrazové analýzy a následně nově vyvinutý programový kód pro hodnocení bakteriální populace na nosiči obrazovou analýzou.

Hlavními cíly této práce jsou:

- Testování reálné odpadní vody v laboratorních experimentech za účelem určení limitních stavů biofilmových reaktorů.
- Vývoj, optimalizace užití nanovláknenného nosiče při degradaci fenolem zatížených odpadních vod.
- Porovnání komerčního a nanovláknenného nosiče.
- Vývoj nového programového kódu pro hodnocení bakteriálního biofilmu.

Teoretická část

2 Biofilm

2.1 Vznik biofilmu

Bakterie jsou nejúspěšnější formou života díky své velké přizpůsobivosti. Žijí volně se pohybující, ve formě tenké vrstvy (shluku) rostoucí na pevných podkladech ponořených, nebo vystavených vodnímu prostředí. Lze se s ním setkat běžně v přírodě i v domácnosti. [6][7]

Formování biofilmu začíná přichycováním volně se pohybujících bakterií k podkladu. První bakterie se přichytí k povrchu velmi slabými silami, které nejsou chemického původu. Pokud nedojde k jejich okamžitému oddělení od povrchu, začnou vytvářet silnější spojení s povrchem pomocí aktivních molekul bílkovin, polysacharidů, které mají na svém těle. První „kolonisté“ vytváří polymerní lepivou matici, která je organizována do pavučinovitých vláken, obklopuje buňky dokola, tím usnadňuje přichycování dalších bakterií. Z matrice se vytváří lešení, ve kterém se buňky množí, tím vytváří mikrokolonie. Buňky jsou schopny se z matrice oddělit, odplout a kolonizovat tak další část povrchu. [6][7][8]

Biofilm může být tvořen jediným bakteriálním druhem, častěji se skládá z několika bakteriálních druhů, které vytváří mikrokolonie. Ty jsou propojeny značně spleťtými kanálky, které jsou u větších kolonií tenčí a tvoří póry. Povrch biofilmu je omýván kapalinou obsahující živiny, které prostupují kanálky, póry a dostávají se do mikrokolonií. [6][7]

V průmyslu se s biofilmem lze setkat zejména v biologickém čištění odpadních vod. Využívá se principu, kdy odpadní voda proudí přes biofilm rostoucí na nosičích, který se „živí“ škodlivými složkami. [6][7]

2.1.1 Struktura biofilmu

Tloušťka biofilmu může kolísat od několika až do stovky mikrometrů, závisí na dostupnosti živin v kapalině omývajícím povrch biofilmu a na tom, zda je tvořen jedním, nebo více druhy bakterií. Biofilm tvořený více druhy bakterií je obvyklejší v prostředí přirozeném než laboratorním. [6][7]

Struktura biofilmu není homogenní, ve skutečnosti je tvořena dutinami, shluky buněk, které tvoří rozsáhlé, spletené a vzájemně propojené kanálky. Jednotlivé vrstvy biofilmu mají různý elektrický náboj, který napomáhá transportu živin. [6][7]

Povrch biofilmu je elastický a v proudu tekutiny se vlní. Biofilm se v silnějším proudu pohybuje po podkladu a zabírá nové neobsazené plochy. Pokud elasticita není schopna udržet biofilm pohromadě, jeho části se odtrhávají. Nehomogenita povrchu biofilmu se vyrovnává při dostatečné, nebo nadbytečné koncentraci živin. Při poklesu živin se vlnky na povrchu znovu vytvoří. [6][7]

Živiny a kyslík jsou do biofilmu přinášeny omývajícím kapalinou, odpadní látky jsou naopak odnášeny. Jejich další proudění do hloubky je zajištěno systémem kanálků. Rychlost proudění v kanálkách je na povrchu pětikrát rychlejší než v kanálkách v hloubce biofilmu. Z kanálku přenášené látky proudí póry do větších mikrokolonií, dále se přenáší jen do určité hloubky a to difuzí. [6][7]

Bakterie žijící v biofilmu mají odlišné vlastnosti než ty volně se pohybující v prostředí. Nejdůležitější vlastností je mechanicky neproniknutelné a ochranné prostředí biofilmu, které organismům umožňuje spolupráci a interakci. Toto prostředí zvyšuje odolnost organismů na chemické látky (hlavně detergenty a antibiotika). [6][7]

2.1.2 Komunikace v biofilmu

V biofilmu bakterie komunikují použitím chemických signálů. Tyto signály mohou dokonce prostupovat vnější membránou a mohou být zachycovány nejen členy stejného druhu, ale i jiných bakteriálních druhů a v některých případech i vyspělejšími organismy. Bakterie produkují chemické signály, na které ostatní bakterie mohou odpovídat, tento proces je známý jako mezibuněčná komunikace, nebo mezibuněčné signály. Tato komunikace může vyústit v koordinované chování bakteriální populace. [8]

Materiál stavební matrice v biofilmu drží buňky v těsné blízkosti a tím umožňuje vytváření signálních molekul v dostatečném množství pro uskutečnění změn v buněčném chování. Bakteriální populace aktivují některé enzymy pouze tehdy, pokud přijímají buněčné signály takové, že je jejich množství dostatečné pro bezpečné využití genetické aktivity. Příkladem lze uvést to, že bakterie nebudou produkovat toxiny do té doby, než obdrží signál o dostatečné populaci pro přežití hostitelovy obrany. [8]

3 Biologické čištění odpadních vod

V biologickém způsobu čištění odpadních vod se využívá samočisticích procesů bakteriálních společenstev. Je tedy zřejmé, že čištění je možné pouze u odpadních vod obsahujících látky, které jsou schopné biodegradace. Principem je napodobování a zintenzivnění přirozeného rozkladu organických látek a procesu samočištění, proto je nutné vytvořit dostatečné podmínky pro nárůst biologických aktivit mikroorganismů. V praxi se ve většině případů užívá aerobních čistících procesů, které mají výhody v rychlém rozkladu nežádoucích látek a rychlém nárůstu biofilmu. [9][10][11]

Biologické čištění odpadních vod se dělí na dva základní typy: přirozené (přírodní) a umělé. Při umělém čištění se provádí degradační procesy několikanásobně rychleji a efektivněji než v čištění přirozeném. Rozkladné pochody procesu biologického čištění odpadních vod probíhají v biologickém reaktoru působením vhodných mikroorganismů, efektivita se dosahuje vytvořením příhodných podmínek pro rozvoj mikroorganismů. Principem umělého čištění je využití odpadní vody jako „živného“ média pro nárůst biofilmu. V praxi se užívají zejména systémy aerobní aktivace – mikroorganismy ve formě suspenze, a biofilmové reaktory – mikroorganismy ve formě nárůstu biofilmu. [9][12]

3.1 Aktivace

Čistící proces aktivace probíhá činností aerobního společenstva mikroorganismů, které odstraňují nečistoty přímo rozkladem, nebo nepřímo pohlcováním malých částic. Z odpadní vody využívají mikroorganismy znečišťující látky jako zdroj energie k životu a tvorbě nových buněk. [9]

Systém s kulturou ve formě suspenze (aktivační proces) je nyní nejrozšířenějším způsobem biologického čištění odpadních vod. Principem aktivace je vytvoření tzv. „aktivační směsi“, která se skládá ze směsné kultury mikroorganismů, kde menší část je rozptýlena ve vodě a větší část tvoří vločky, tzv. aktivovaný kal. Kultura vzniká směřováním přítoku odpadní vody a recirkulovaného aktivovaného kalu za neustálého provzdušňování a míchání v aktivační nádrži. Během pobytu v aktivační nádrži dochází k přírůstku aktivovaného kalu a tím i úbytku organických degradovatelných látek. Směs aktivovaného kalu a čištěné vody se odvádí do dosazovací nádrže, kde dochází k zahuštění a oddělení aktivovaného kalu a vyčištěné vody. Část aktivovaného kalu se recirkuluje zpět do aktivační nádrže, čímž se udržuje koncentrace potřebná

pro degradaci organických látek. Celý čistící proces probíhá v otevřeném a nesterilním systému. Složení aktivovaného kalu se stabilizuje dle složení odpadní vody a technologie aktivace. [9][12]

3.1.1 Biofilmové reaktory

Čistící systémy s kulturou mikroorganismů ve formě nárůstu se nazývají biofilmové reaktory, své využití nalézají zejména v menších městských čistírnách odpadních vod, kde nejsou kladeny extrémně vysoké nároky na kvalitu vyčištěné vod. Biofilmové reaktory se hojně používají pro předčištění odpadních vod před vypouštěním do veřejné kanalizace. [12]

Biofilmové reaktory jsou nádoby nepodléhající korozi různých objemů, od 0,5 l až do 1000 m³. Nádoby jsou naplněny přírodním, nebo umělým materiálem, který tvoří podklad pro růst společenstva různých mikroorganismů. Činností tohoto narostlého společenstva je realizován proces biologického čištění odpadních vod. [9][13]

Biofilmové reaktory jsou běžně vybaveny [13]:

- vnitřním, nebo vnějším chlazením a ohříváním
- míchacím zařízením
- přívodem vzduchu a odvodem výdechových plynů
- odpěňováním mechanickým, nebo chemickým
- zařízením pro odběr vzorků
- regulací a měřením teploty, pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku, oxidu uhličitého, redox-potenciálu
- měřením obsahu kyslíku a oxidu uhličitého v odcházejícím plynu
- měřením koncentrace biomasy

V čistírenské praxi se lze setkat s dvěma základními konstrukcemi biofilmových reaktorů [12]:

- biologické kolony (biofiltry) – skrápěné, ponořené
- rotační biofilmové reaktory – diskové, klecové

V biologické koloně je čerpaná voda rozstříkována rotujícím skrápěcím zařízením po povrchu náplně. Po náplni stéká odpadní voda a dochází ke kontaktu s biofilmem, který je již stabilizovaný po kontaktu s náplní. Lože biologické kolony je provzdušňováno pomocí větracích okének umístěných pod roštem biofilmu. [12]

V rotačním biofilmovém reaktoru jsou na společné hřídeli umístěny plastové disky, které slouží jako nosiče biomasy. Hřídel rotuje ve žlabu, kterým protéká odpadní voda a biomasa se střídavě dostává do kontaktu s ní a vzduchem. Disky mají povrch upravený prolisy pro maximalizaci kontaktní plochy a zlepšení kontaktu odpadní vody s povrchem biofilmu. Rotační biofilmové reaktory nalézají uplatnění v malých a domovních čistírnách. Je u nich oceňována zejména široké uplatnění, jednoduchost obsluhy a údržby, ale i nízká spotřeba energie. [12]

Biofilmové reaktory jsou v laboratorních podmínkách provozovány v těchto kultivacích [14]:

- Vsádkové (batch) – veškeré živiny a kultura mikroorganismů přivedeny na počátku kultivace, tudíž kultivace probíhá až do jejich úplného vyčerpání.
- Přítokové – živiny jsou dávkovány do bioreaktoru v určitých časových obdobích, živiny jsou přiváděny přítokem, odtok se neprovádí, produkt proto zůstává v reaktoru, tudíž narůstá jeho objem.
- Kontinuální – charakteristická plynulým rovnoměrným přítokem živin a odtokem média, tím je dosaženo konstantního objemu a ustáleného stavu reaktoru.

3.2 Odpadní vody

Znečištění vody je definováno jako změna fyzikálních, chemických a biologických vlastností, které omezují, nebo znemožňují její použití k danému účelu. Velké spektrum znečišťujících látek předpokládá neexistenci ekonomického způsobu jak odstranit všechny tyto látky. Proto je obvyklé zařazení několika čistících procesů za sebou (tzv. technologická linka čištění). [20]

3.3 Organické látky v odpadních vodách

Odpadní vody obsahují velké množství různých organických látek, proto se kvalitativní ani kvantitativní stanovení jednotlivých sloučenin neprovádí. Pouze v některých případech se stanovují určité skupiny látek např. anionaktivní tensidy, AOX, kyanidy, fenoly. Obvykle se stanovuje skupina příbuzných látek, proto jsou taková stanovení nazývána skupinovými. Mezi skupinová stanovení patří metody, které stanovují sumu všech organických látek pomocí kyslíku spotřebovaného na jejich oxidaci. Obecně se užívá vyjádření jako chemická spotřeba kyslíku (CHSK). [20]

3.4 Fenol v odpadních vodách

Fenol je inhibitorem a toxickou složkou vyskytující se v odpadních vodách z rafinerií ropy, petrochemického průmyslu a farmaceutických závodů. Přestože je fenol inhibitorem a toxickou složkou, je také významným zdrojem uhlíku a energie pro některé mikroorganismy. Aerobní bakterie mají schopnost degradace fenolu jako jediného substrátu. Cílem je využít degradovatelnou odpadní vodu jako substrát pro mikroorganismy. [21][22]

3.5 Biodegradace, bakteriální růst

Biodegradace organických látek je úzce spjata s růstem mikroorganismů. Vhodné je při hodnocení bakteriálního společenstva kontinuálně sledovat stav mikroorganismů v systému. Mikroorganismy se v reaktorech nachází volně (dispergované), nebo vázané na nosiči. Volné organismy je možné hodnotit pomocí optické denzity. Hodnocení mikroorganismů vázaných na nosiči lze provádět stanovením sušiny. Stanovení sušiny je však zatíženo chybou nerozpuštěných látek, které jsou v odpadních vodách přítomny, je nutná eliminace anorganických nerozpuštěných látek (NL) na stanovení biomasy. Dalším ze způsobů hodnocení vázaných mikroorganismů je mikroskopické snímání spojené s následnou obrazovou analýzou snímků. [24]

Růst organismů je maximální, když k němu mají optimální podmínky. Podmínky se liší dle typu organismu, živného média, ale i způsobu kultivace. Rychlost růstu je tak dána schopnostmi mikroorganismů a také faktory prostředí. Hlavními faktory prostředí jsou doba zdržení biomasy a odpadní vody, koncentrace přiváděného substrátu, obsah živin, rozpuštěný kyslík, teplota a pH. Pokud má přiváděný substrát s organickým znečištěním sloužit jako zdroj živin a energie pro růst mikroorganismů, je nezbytné sledovat koncentraci živného média, v našem případě měření CHSK. Růstová rychlost je ovlivněna změnami faktorů prostředí a není tak v průběhu konstantní.

Účinnost čištění vody je ovlivněna nevyvážeností odpadní vody, zvláště z hlediska živin. Pro růst a reprodukci mikroorganismů je potřebný uhlík jako jeden z významných zdrojů energie. Dále se jedná zejména o prvky, jako jsou fosfor a dusík. Městské odpadní vody obecně obsahují nadbytek těchto živin, v průmyslových odpadních vodách je jich naopak nedostatek. Růst organismů je stimulován přidáním anorganických sloučenin dusíku a fosforu. [27][28]

Rychlost procesu biodegradace pomocí mikroorganismů ovlivňuje také teplota v systému. Mikrobiální aktivita stoupá s rostoucí teplotou, zvýšení teploty tedy může zrychlit degradační procesy, avšak extrémní teplota může způsobit pokles růstu mikroorganismů, neboť může docházet ke snižování rozpustnosti kyslíku. Z těchto důvodů se procesy biodegradace realizují v teplotně kontrolovatelném zařízení. [24][26]

Vliv teploty na systém se také projevuje u nebiologických mechanismů degradace kontaminantů. Při vyšších teplotách dochází k odparu vody, kultivační médium se zahušťuje a narůstá salinita. Vzestup salinity může snižovat, nebo dokonce inhibovat rychlost biodegradace. Nízké teploty naopak způsobují srážení látek a tím dochází k zanášení propojovacích prvků čistícího systému. [27][28]

Vysoká alkalita, nebo acidita nepříznivě ovlivňují proces degradace. Extrémní hodnoty pH (nižší než 5 a vyšší než 10) ovlivňují aktivitu mikroorganismů a tím zpomalují proces biodegradace. Optimální hodnoty pH se pro většinu bakterií pohybují od 6 do 8. Hodnota optimálního pH je však dána užitým bakteriálním rodem, podmínkami v reaktoru, druhem odpadní vody a jinými faktory. [27][28]

Biologické čištění průmyslových odpadních vod, zvláště biodegradace, může být negativně ovlivněno vysokým obsahem solí ve vodě, který může zpomalovat, nebo zcela inhibovat rychlost biodegradace. [27][28]

4 Metody obrazového hodnocení biofilmu

4.1 Vyhodnocování struktury biofilmu

Struktura biofilmu může ovlivňovat mikrobiální aktivitu biofilmu, jeho růst a tím i možnosti přenosu živin do hlubších vrstev biofilmu. Různé druhy biofilmu se liší vizuálně, mají různou strukturu. Odlišnosti jsou způsobeny faktory prostředí, které ovlivňují jejich růst a aktivitu. Faktory prostředí jsou různé od fyzikálních až po chemické. Vystává zde však možnost, že struktura biofilmu odráží základní procesy, které v něm probíhají, tj. uchycení, odpoutání a růst mikroorganismů. Pro ověření těchto hypotéz je nutné sledovat a vyhodnocovat vhodnými prostředky strukturu biofilmu. [4][15]

Zkoumání struktury biofilmu se dříve omezovala na výpočet fraktální dimenze a porozity biofilmu. Avšak v posledních letech se vyvinuly nové komplexní sady měření, které jsou vztaženy k procesům probíhajícím v biofilmu, tudíž unikátně popisují jeho strukturu. Myšlenka měření je taková, že v heterogenním biofilmu se nachází konečný počet parametrů, které mohou být změřeny a užity k hodnocení unikátních znaků struktury biofilmu. Strukturu biofilmu (území, kde se nalézá biomasa v prostoru) je nezbytné měřit vhodnými prostředky, které jsou citlivé na výskyt biomasy a zároveň budou věrně reprezentovat morfologii biofilmu. Jednou z možností je měření lokální efektivní difuzivity, tedy oblasti, kterou zabírá biomasa. Nevýhodou takového měření je nutnost velkého počtu opakování. Tudíž se jako nejlepší a nepraktičtější způsob jeví vyhodnocovat rozmístění biofilmu ze snímků získaných optickou, případně laserovou mikroskopií. Takovýmto způsobem získáváme vizualizaci rozmístění biomasy. Pro porovnání s aktivitou biofilmu a vnitřními procesy v něm probíhajícími je nutné vizualizované rozmístění vyjádřit kvantitativně. [4][15]

Velikost a tvar shluků jsou příklady znaků struktury biofilmu. Úspěšnost, s jakou znaky struktury reprezentují heterogenitu, je založena na jejich souvislosti se změnami v procesech, které vytvořily biofilm a ovlivňují jeho chování za známých podmínek. Z tohoto důvodu je možné se domnívat, že velikost buněčných shluků, nebo neobsazeného prostoru může mít spojitost se změnami v populaci a stavu živin, tvar shluků může mít spojitost s hydrodynamikou. [4][15]

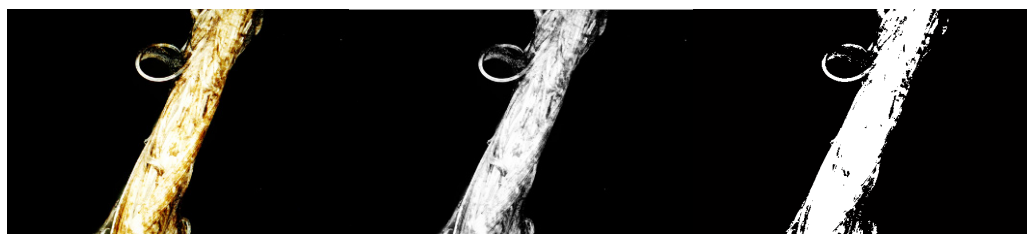
Snímky rozmístění biomasy v prostoru obsazeném biofilmem jsou užívány pro výpočet parametrů charakterizujících strukturu biofilmu, které však nereflektují

žádné procesy probíhající v biofilmu, jsou tedy hodnotou matematických funkcí charakterizujících rozmístění pixelů ve snímcích biofilmu. [4][15]

4.2 Typy snímků

Snímky biofilmu pořízené optickou, nebo laserovou mikroskopií (barevné (RGB) snímky) je nutné převést do škály šedé, ze které mohou být následně v případě potřeby převedeny na binární obraz. [4]

Škála šedé má 256 stupňů, užívá osmi bitů informace (hodnot 0 a 1). V barevných snímcích biofilmu je každý pixel popsán jedním z 256^3 (16 777 216) stupňů barev, což způsobuje výpočetní složitosti a zdržení při manipulaci s velkými soubory. Zrychlení operací s RGB snímky se dosahuje jejich převodem do stupňů šedi, kde je každý pixel matice charakterizován typem integer (0 – 1). [4]



Obr. 4.1 Snímek biofilmu původní, ve škále šedé a binární

4.3 Hodnocení parametrů struktury

Parametry popisující strukturu biofilmu je možné rozdělit na texturní, které popisují heterogenitu snímku, a plošné, které popisují morfologické vztahy mezi hodnotou orientace a tvarem povrchových znaků. [15]

Ze snímků biofilmu převedených do škály šedé se počítají texturní parametry, kdežto plošné parametry jsou počítány ze snímků binárních. Převod snímků ze škály šedé do binárního obrazu (černo/bílé) se běžně provádí pomocí iterativní selekce hodnoty prahování, která rozdělí snímek na černou (pozadí) a bílou (biofilm). Každý snímek je reprezentován jako matice, jejíž elementy jsou numerické hodnoty škály šedé příslušných pixelů. Hodnoty pixelů jsou užity pro výpočty strukturních parametrů. [15]

4.4 *Prahování snímků biofilmu*

Prahování je segmentační metoda, která redukuje škálu barev na několik odstínů. V případě snímků zachycujících biofilm se prahováním redukuje 256 odstínů šedé na dva odstíny, které rozdělí snímek na biomasu a neobsazený prostor (resp. pozadí a nosič). Hodnota prahu je určována subjektivně volbou jednoho z 256 odstínů šedé. Snahou při volbě prahu je nalezení hodnoty, která bude nejlépe reprezentovat rozdíly mezi biomasou a volným, neobsazeným prostorem, poté se snímek segmentuje dle vybraného prahu. [4][15]

Získání statisticky smysluplných a objektivních morfologických parametrů ze snímků biofilmu umožňuje automatizace prahování, kterou získáváme možnost mnohokrát tuto činnost opakovat. Automatizace prahování je nezbytná zejména proto, že volba hodnoty prahu je jinak čistě subjektivní a záleží na zkušenostech laboranta, znalostech o snímku a požadovaným vztahem dvou segmentů z výsledné segmentace. Z toho vyplývá, že každý laborant (ale také programátor) získá ze stejných binárních snímků odlišné hodnoty měření. [4][15]

Prahováním není možné dosáhnout absolutní správnosti měření, tudíž je vhodné porovnávat výsledky automatických prahovacích metod s metodami prahování prováděných zkušenými pracovníky ve speciálních manuálních programech k tomu určených. Cíl těchto porovnání by měl být takový, že akceptovatelným výsledkem automatického prahování je hodnota blízká se průměrné hodnotě získané prahováním prováděným pracovníky (nejlépe několika). Z tohoto důvodu prahování prováděné lidským faktorem může přinášet průměrně lepší výsledky. Naopak automatické prahování má nesporné výhody v rychlosti vyhodnocení, snadnosti opakování a objektivním hodnocení na velké sadě snímků. Počtem opakování a ověřování je možné dosáhnout minimálně stejně dobrých výsledků jako s manuálními programy. [4]

4.5 *Texturní parametry*

Texturní parametry měří heterogenitu v biofilmu tím, že porovnávají velikost, pozici a/nebo orientaci složek biofilmu (vizuálních komponent). Parametry jsou počítány z 8 bitových snímků škály šedé, kde je každý pixel ohodnocen od 0 do 255. Textura je definována jako směr změny barevnosti snímku, může být popsána jako jemná, hrubá, náhodná, vlnitá, nepravidelná. Texturu lze také definovat jako opakující

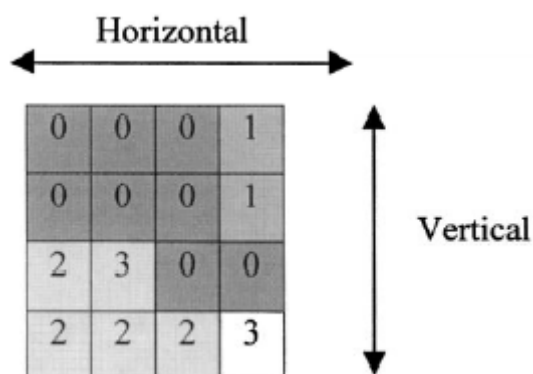
se vzor střídání intenzity snímku, tím popisuje rozdělení stupňů tonů šedi v okolí. Parametry měří změny škály šedé v buněčném shluku a v okolním prostoru na základě pravděpodobnosti toho, že v okolí se budou nacházet pixely stejného, nebo podobného typu.

Pro analýzu okolí se používají parametry textury [4][15]:

- Entropie textury – míra náhodnosti ve škále šedi obrazu. Čím vyšší, tím je struktura biofilmu heterogennější.
- Energie – míra směrově se opakujících vzorů pixelů. Vyšší energie indikuje větší směrovou jednotnost, struktura snímku je tedy více homogenní.
- Homogenita – míra prostorově se opakujících vzorů pixelů. Hodnoty homogenity značí větší, či menší změny v kontrastu snímku.

Výše zmíněné parametry textury se vypočítávají z tzv. GLCM (Gray level co-occurrence matrix), která obsahuje informace o pozicích pixelů, které mají shodnou hodnotu škály šedé. GLCM je spočtena z matic prostorové závislosti (Spatial dependence matrix) v horizontálním a vertikálním směru. Matice prostorové závislosti v horizontálním a vertikálním směru popisují intenzitu změny v příslušném směru. [4][15]

Snímek biofilmu 4 x 4 se čtyřmi hodnotami škály šedé (0-3).



Obr. 4.2 Vstupní snímek pro matici prostorové závislosti [15]

Horizontální matice prostorové závislosti ze snímků:

$$P_H = \{p_H(a,b)\} = \begin{bmatrix} p_H(0,0) & p_H(0,1) & p_H(0,2) & p_H(0,3) \\ p_H(1,0) & p_H(1,1) & p_H(1,2) & p_H(1,3) \\ p_H(2,0) & p_H(2,1) & p_H(2,2) & p_H(2,3) \\ p_H(3,0) & p_H(3,1) & p_H(3,2) & p_H(3,3) \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 10 & 2 & 0 & 1 \\ 2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 4 & 2 \\ 1 & 0 & 2 & 0 \end{pmatrix}$$

Obr. 4.3 Matice horizontální prostorové závislosti [15]

$p_H(0,0)$ je počet změn škály šedé z 0 na 0 v horizontálním směru. Je zde pět změn z 0 na 0 ve směru zleva doprava a také pět zprava doleva, poté je $p_H(0,0) = 10$. $p_H(0,1)$ je počet změn škály šedé z 0 do 1 v horizontálním směru (v obou směrech).

Obdobně se vypočte vertikální matice prostorové závislosti:

$$P_V = \{p_V(a,b)\} = \begin{bmatrix} p_V(0,0) & p_V(0,1) & p_V(0,2) & p_V(0,3) \\ p_V(1,0) & p_V(1,1) & p_V(1,2) & p_V(1,3) \\ p_V(2,0) & p_V(2,1) & p_V(2,2) & p_V(2,3) \\ p_V(3,0) & p_V(2,1) & p_V(2,2) & p_V(3,3) \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 8 & 1 & 2 & 2 \\ 1 & 2 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 2 & 1 \\ 2 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$$

Obr. 4.4 Vertikální matice prostorové závislosti [15]

Matice prostorové závislosti je sumou horizontální a vertikální matice prostorové závislosti:

$$P_{HV} = P_H + P_V = \{p_{HV}(a,b)\} = \begin{pmatrix} 18 & 3 & 2 & 3 \\ 3 & 2 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 6 & 3 \\ 3 & 0 & 3 & 0 \end{pmatrix}$$

Obr. 4.5 Matice prostorové závislosti [15]

Normalizace je provedena sumou všech elementů a vydělením každého elementu sumou:

$$sum = \sum_a \sum_b p_{HV}(a,b) = 48$$

$$P_N = \{p(a,b)\} = \begin{pmatrix} 0.375 & 0.063 & 0.042 & 0.063 \\ 0.063 & 0.042 & 0 & 0 \\ 0.042 & 0 & 0.125 & 0.063 \\ 0.063 & 0 & 0.063 & 0 \end{pmatrix}$$

Obr. 4.6 Normalizace matice prostorové závislosti [15]

Na základě normalizované matice prostorové závislosti P_N jsou texturní parametry definovány jako:

$$\text{Entropie textury, TE} = -\sum_{a,b} \sum_{P(a,b) \neq 0} p(a,b) \ln(p(a,b)) \quad (1)$$

$$\text{Energie, E} = \sum_a \sum_b \{p(a,b)^2\} \quad (2)$$

$$\text{Homogenita, H} = \sum_a \sum_b \frac{1}{1+(a+b)^2} p(a,b) \quad (3)$$

4.6 Plošné parametry

Parametry plochy popisují morfologickou strukturu biofilmu, zejména velikost, tvar a orientaci podstatných částí. Každý z parametrů měří charakteristiku plochy buněčného shluku, nebo volný neobsazený prostor. Z tohoto důvodu je nezbytné pomocí obrazové analýzy oddělit buněčné shluky od neobsazeného prostoru, což se provádí segmentací obrazu (viz 4.4). [4][15]

4.6.1 Plošná porozita

Plošná porozita je definována jako poměr prázdné plochy k celé ploše, tento poměr se snadno získá z binární matice snímku biofilmu: [4][15]

$$\text{Plošná porozita} = \text{AP} = \frac{\text{Počet_prázdných_pixelů}}{\text{Celkový_počet_pixelů}}. \quad [4][15] \quad (4)$$

V následujícím binárním snímku je počet prázdných pixelů 19, celkový počet pixelů je 36, plošná porozita je tedy $19/36 = 0,528$. [4][15]

0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	0
0	0	0	0	1	0

Obr. 4.7 Snímek pro výpočet plošné porozity [4][15]

4.6.2 Délka běhu

Průměrná délka běhu (Average run length) je průměrem hodnot pixelů shluků biomasy nacházejících se ve snímku nepřetržitě za sebou. Průměrná horizontální délka běhu je průměrem počtu po sobě jdoucích pixelů s hodnotou jedna (buněčný shluk) v řadě. Obdobně je definována průměrná vertikální délka běhu. Průměrná délka běhu měří očekávaný rozměr buněčného shluku v každém směru, je tedy měřením buněčného shluku. [4][15]

0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	0	0
0	0	1	1	1	0	0
0	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Obr. 4.8 Délka běhu [15]

V binárním snímku biofilmu je jedničkou značen shluk pixelů. Průměrná horizontální délka běhu je $(3 + 3 + 5 + 5)/4 = 4$ (pixelů). [4][15]

Průměrné horizontální a vertikální délky běhu se spočtou podílem celkového počtu pixelů a celkového počtu běhů v každém směru. [4][15]

4.6.3 Difuzní vzdálenost

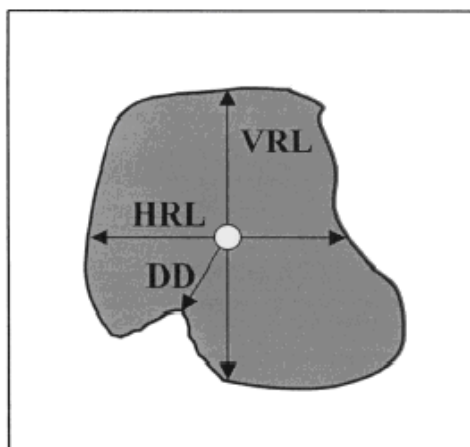
Difuzní vzdálenost pro shluk je měření minimální vzdálenosti ze shluku buněk do neobsazeného prostoru. Minimální vzdálenost může být např. měřítkem vzdálenosti zdroje živin pro buňku. Difuzní vzdálenost je definována jako minimální vzdálenost z pixelu ve shluku k jeho nejbližšímu prázdnému pixelu ve snímku. Existují dvě měřítka difuzní vzdálenosti, průměrná a maximální. Průměrná difuzní vzdálenost (Average diffusion distance, ADD) je průměrem minimální vzdálenosti difuze z každého pixelu shluku do nejbližšího prázdného pixelu, vztaženo na všechny shluky pixelů ve snímku. Maximální difuzní vzdálenost (Maximum diffusion distance, MDD) je vzdálenost z nejvzdálenějšího pixelu v shluku pixelů do nejbližšího prázdného shluku. Větší difuzní vzdálenost indikuje větší vzdálenost, kterou musí substrát doputovat (difundovat) ve shluku buněk. [4][15]

ADD se vypočte pomocí Euklidovské vzdálenosti $D_E = \sqrt{x^2 + y^2}$. (5)

Pro binární snímek $M \times N$, (i,j) je elementem snímku $|P(i,j)|$ difuzní vzdálenost z pixelu na pozici (i,j) a je vypočtena jako Euklidovská vzdálenost do pixelu shluku z nejbližšího prázdného pixelu. [15]

$$P(i,j) = (P_i, P_j) \quad 0 \leq i \leq M-1, \quad 0 \leq j \leq N-1$$

$$|P(i,j)| = \sqrt{P_i^2 + P_j^2}$$



Obr. 4.9 Diagram shluku buněk (Difuzní vzdálenost (DD), horizontální délka běhu (HRL), vertikální délka běhu (VRL)) [15]

4.6.4 Hranice

Hranice je definována jako celkový počet pixelů, které jsou na hranici buňky, jsou tedy počítány pouze pixely s meziprostorem. Určení hranice je možné provést několika způsoby: od binárního originálního snímku odečteme snímek, u něhož proběhla binární eroze (byl zmenšen o jednu vrstvu), další možností je od snímku podrobeného binární dilataci (byl rozšířen o jednu vrstvu) odečíst binární originální snímek.

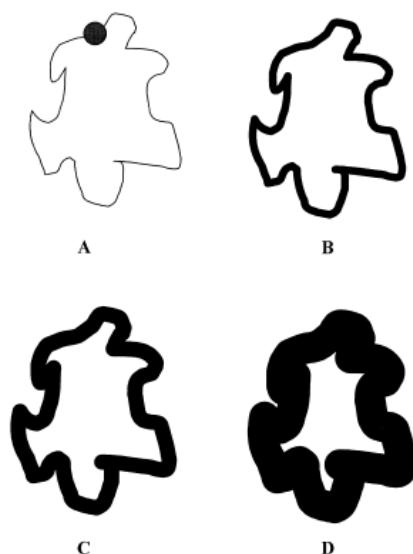
0	0	0	0	0
0	0	1	0	0
0	1	0	1	0
0	0	1	0	0
0	0	0	0	0

Obr. 4.10 Hranice [4]

4.6.5 Fraktální dimenze

V prostoru měří fraktální geometrie stupeň nepravidelnosti hranice objektu, fraktální rozměr se pohybuje mezi hodnotami 1 a 2 (pro 2D). Čím vyšší je hodnota fraktální dimenze, tím nepravidelnější je hranice objektu. Při užití v obrazové analýze biofilmu je zřejmé, že čím nepravidelnější jsou hranice biofilmu, tím vyšší je fraktální dimenze. [15]

Pro výpočet fraktální dimenze v obrazové analýze se užívá metoda *Minkowski*. Metoda měří fraktální dimenzi určováním míry změny v hranici objektu tím, jak vzrůstá tloušťka hranice. Opakováním se dlouhé a nepravidelné hranice stávají kratšími a užíváním silnějších hranic jsou vyhlazovány nepravidelnosti. Takovýto postup je při zpracování obrazu popisován jako dilatace. Při dilataci je užito dilatačního kruhu, který se nepřetržitě pohybuje po hranici. Pohybem kruhu po hranicích dochází k vyhlazování linie hranice. [4][15]



Obr. 4.11 Dilatace pomocí dilatačních kruhů různých průměrů [15]

Vypočtení hranice je prováděno nastavením pixelů hranice na hodnotu 0 a všech ostatních na jedna. Posléze spočteme Euklidovskou vzdálenost, tím získáme vzdálenost každého pixelu od hranice. Velikost dilatované oblasti zjistíme spočtením pixelů, které jsou menší než poloměr zvoleného dilatačního kruhu. Z toho vyplývá, že hranice se vypočte [4][15]:

$$Hranice = \frac{Dilatovaná_oblast}{Průměr_kruhu} \quad (6)$$

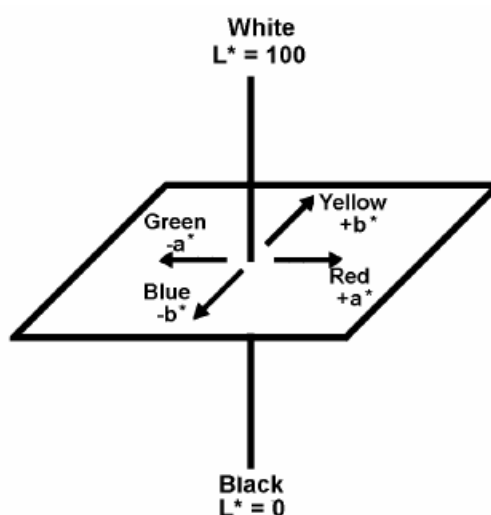
4.7 Barevný prostor CIE $L^*a^*b^*$

Barevný model CIE $L^*a^*b^*$ (Lab) je založen na lidském vnímání barev. Je jedním z barevných modelů vytvořených organizací CIE (Commission Internationale d'Eclairage), která se věnuje vytváření standardů pro všechny aspekty světla.

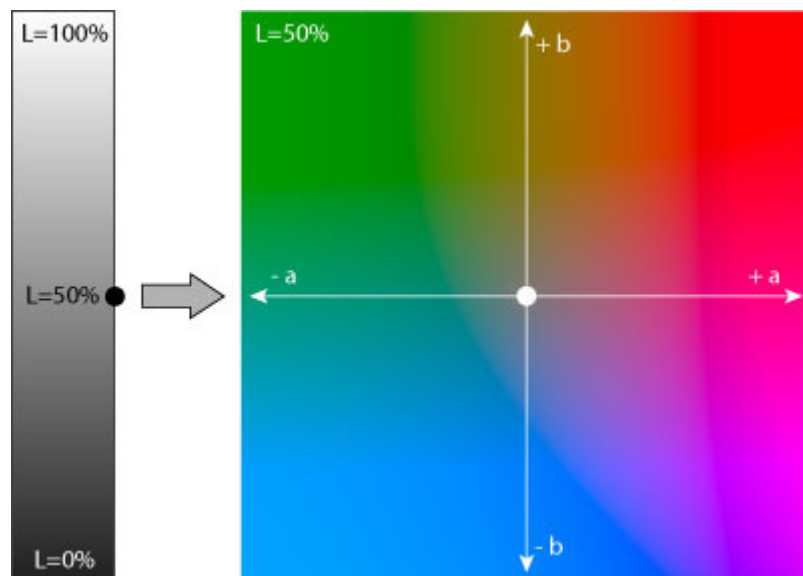
Číselné hodnoty v prostoru $L^*a^*b^*$ popisují všechny barvy, které je člověk schopen vidět. Prostor $L^*a^*b^*$ popisuje, jak barva vypadá, než kolik určité barevné složky je pro její interpretaci nějakým zařízením (např. monitorem, stolní tiskárnou, nebo digitálním fotoaparátem) potřebné. Z tohoto důvodu je považován za barevný model nezávislý na zařízení. [33]

CIELAB ($L^*a^*b^*$) poskytuje standard – barevnou škálu, která se užívá pro jednoduché porovnání hodnot barev. [34]

V barevném prostoru $L^*a^*b^*$ jsou rozdíly mezi body vykresleny tak, že korespondují k vizuálním rozdílům mezi vykreslenými barvami. $L^*a^*b^*$ je organizován do formy kostky. Osa L^* je nazývána měrná světlost, vede od vrchu dospodu kostky, maximální hodnotou je 100 (bílá), minimální hodnotou je 0 (černá). Chromatické osy a^* a b^* nemají žádné specifické číselné limity, kladná část osy a^* je červená, negativní zelená. Kladná část osy b^* je žlutá, záporná modrá (Obr. 4.12 a Obr. 4.13). [34][35]



Obr. 4.12 Osy barevného prostoru $L^*a^*b^*$ [34]



Obr. 4.13 Osy barevného prostoru L^*a^*b (2) [36]

V L^*a^*b barevné škále existují tzv. delta hodnoty (ΔL^* , Δa^* a Δb^*), které měří míru odlišnosti standardu a vzorku v L^* , a^* , b^* . Ze souřadnic chromatických os a^* , b^* lze vypočítat veličiny, které odpovídají lidskému pojetí tvorby barev. Jednou z nich je měrná čistota *chroma* C^*_{ab} (sytost), která vyjadřuje vzdálenost od středu chromatické roviny a^*b^* . [34][35]

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (7)$$

Barevný prostor L^*a^*b umožňuje výpočet objektivních odchylek ΔE^*_{ab} (rozdíl barev) mezi jednotlivými barvami z odchylek jasů ΔL^* a odchylek chromatických souřadnic Δa^* a Δb^* . ΔE^*_{ab} je obecně uznávanou metodou hodnocení rozdílu barev. [34][35]

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} . \quad (8)$$

4.8 K-Means Clustering

Shluková analýza tvoří skupiny, nebo shluky dat. Existuje mnoho metod shlukování (clustering), které jsou užívány pro různé účely. K-Means je shlukovací algoritmus užíváný k určení přirozených barevných seskupení vyskytujících se v sadě dat.

K-Means je rozdělovací metodou, funkce *kmeans* programu Matlab rozděluje objekty do k vzájemně jedinečných shluků, kde k je počet shluků, které mají být lokalizovány v datech. K-Means přiřazuje každému objektu pozici v prostoru. Snahou je nalézt takové rozdělení, které by objekty do shluků dělilo dle toho, že objekty

ve stejném shluku jsou si vzájemně co nejbližší, jak je to jen možné a od objektů v jiných shlucích jsou co nejdále. Pro měření těchto vzdáleností se užívá Euklidovská vzdálenost. Posléze K-Means vrací pro jednotlivé objekty index shluku, ke kterému byl přidělen v každém opakování. Každý segmentovaný shluk je definován svými objekty a jeho středem. Střed je pro každý shluk bod, do kterého je suma vzdáleností ze všech objektů ve shluku nejmenší. [32][37][38]

K-Means užívá iterativní algoritmus, který snižuje sumu vzdáleností z každého objektu k jeho středu pro všechny shluky. Detaily minimalizace je možné ovlivňovat vstupními parametry – počáteční pozicí středů shluků a také maximálním počtem iterací. [37]

Nevýhodou shlukovacího algoritmu K-Means je v některých případech pomalost a časová náročnost – způsobená vykonáváním iterací, a nezbytným zadáním vstupních podmínek uživatelem. [39]

Praktická část – materiály a metody

5 Odpadní vody v laboratorních experimentech

V laboratorních experimentech byla pozornost věnována biologickému čištění odpadních vod s vysokým obsahem fenolů, kresolů a dimethylfenolů. Použita byla podzemní voda z areálu bývalé výroby fenolů s následujícím minimálním a maximálním zastoupením: fenoly (172 – 1642 mg/l), kresoly (59 – 1110 mg/l), dimethylfenoly (48 – 285 mg/l), vyšší fenoly (13 – 19 mg/l). Toxická dávka pro ryby je 5 mg/l (jako maximální povolené hodnoty odtoku z reaktorů považujeme 300 mg/l, námi ověřovaná technologie má sloužit k předčištění odpadní vody, reálně bude za ČOV umístěna další dočišťovací jednotka, kde budou případné zbytkové koncentrace dočišťovány). Toxická dávka pro bakterie je 766 mg/l.[23]

6 Nosiče biofilmu

6.1 AnoxKaldnes MBBR

Technologie AnoxKaldnes MBBR („Moving Bed Biofilm Reactor“) je efektivní, kompaktní a jednoduchá na provoz. Funguje na principu biomasy ve formě biofilmu. Návrh nosiče je zohledněn z hlediska vhodného proudění substrátu a kyslíku k mikroorganismům. Na chráněném povrchu nosiče ve tvaru plastového kroužku s vnitřními žebry, které tvoří velký vnitřní povrch, se vytváří biofilm z mikroorganismů. Nosiče jsou udržovány v neustálém pohybu pomocí aeračního systému v aerobním reaktoru. Biofilm, který narůstá na vnitřní struktuře nosičů, degraduje polutanty. Tyto polutanty, které je potřeba odstranit pro vyčištění vod slouží jako substrát pro růst biofilmu. Procesy založené na biofilmové biomase mají výhodu zvýšené odolnosti vůči toxicitě a změnám v zatížení. Technologie AnoxKaldnes se užívá jak v průmyslovém, tak i komunálním čištění vod. [16][17]



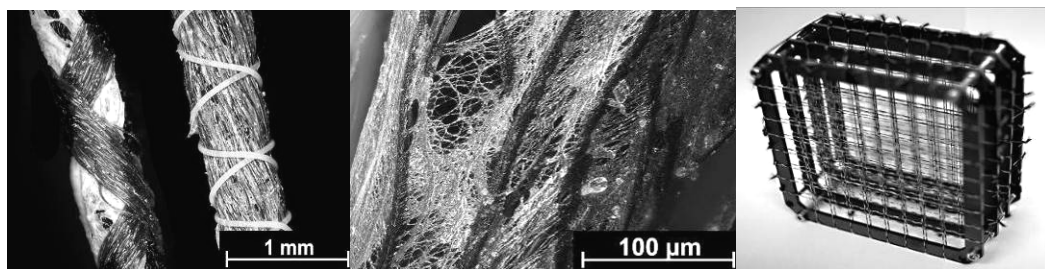
Obr. 6.1 Komerční nosič AnoxKaldnes typ K3

AnoxKaldnes nosiče (typ K3) jsou vyrobeny z polyetylenu (HDPE) s hustotou mírně nižší než voda, se specifickým chráněným povrchem $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$ [49], v laboratorním experimentu dosahoval $0,45 \text{ m}^2/\text{l}$. Nosiče se udržují v neustálém pohybu působením dmýchaného vzduchu v aerobním systému. Technologie využívající plastové AnoxKaldnes nosiče byla původně vyvinuta společností AnoxKaldnes, nyní je komercializována společností Veolia Water Solutions & Technologies. [18]

6.2 Nanovláknenné nosiče

Technologie nanovláknenných nosičů je již řadu let vyvíjena na Technické univerzitě v Liberci, ve spolupráci několika fakult. Velkou výhodou těchto nosičů je možnost kombinovat různé polymery a tím nastavovat denzitu nosiče (od hustoty cca $900 \text{ kg}/\text{m}^3$ až po $1200 \text{ kg}/\text{m}^3$), v podstatě přímo dle požadavků dané čistírny odpadních vod. Výchozími materiály pro nanovláknenné nosiče jsou polyetylen, polypropylen a polyuretan. Metoda elektrospinning aplikovaná v zařízení NANOSPIDER je určující pro zpracování nanovláknenných vrstev s příslušnými vlastnostmi. [18]

Samotná nit je tvořena třemi částmi. Základní vlákno je polypropylen Prolenvir CE (660 dtex, tvarovaný vzduchem), povlak se skládá z polyuretanových nanovláken Larithane 1083 (50 dtex, metoda electrospinning, průměr nanovláken je cca 260 nm), vše je dvojitě obtočeno ochranným polyetylenovým vláknem (167 dtex, chrání vůči tření při zpracování a při následných aplikacích proti dezintegraci nanovláken). Díky využití nanovláknenné technologie tak může povrch finálně dosáhnout až $20 \text{ m}^2/\text{g}$ (resp. $800 \text{ m}^2/\text{m}^3$). V laboratorním experimentu dosahoval měrný povrch $0,67 \text{ m}^2/\text{l}$. [18]



Obr. 6.2 a) Různý způsob fixace nanovrstev (starý a nový), b) Detail nanovláken na nosiči c) Mechanismus ukotvení nití do pevného rámu.

Výsledné nitě byly navinuty na pevný rám (10 x 10 cm) s velikostí oka cca 1 cm. Horizontálně bylo navinuto osm nití o délce 20 cm, stejně tak vertikálně (Obr. 6.2 c)). Rám byl poté volně vložen do reaktoru.

6.3 Nosiče v laboratorních experimentech

Cílem užití nosičů v laboratorních modelech bioreaktorů je porovnání dvou typů nosičů – nového typu nosiče, nosné nitě s nánosem nanovláknů, a komerčního nosiče AnoxKaldnes. Nanovláknenný nosič má výhodu tzv. nanovláknenné podložní matice, jejíž vysoký specifický povrch umožňuje mikroorganismům mimo jiné mnohem vyšší adhezi k povrchu, na rozdíl od jiných materiálů – např. od AnoxKaldnes, na kterých musí bakterie nejprve narušovat povrch, než jej kolonizují. Nanovláknenné nosiče mají celkově výhodnější základní nosný povrch – nejen při úvodní kolonizaci, ale také při revitalizaci v probíhajícím procesu, po extrémních nárazových stavech – jako jsou např. výkyvy teplot, či průtoku.

7 Výběr mikroorganismů

Zvolené mikroorganismy by měly splňovat několik základních podmínek: být nepatogenní, schopné narůstat ve formě biofilmu a degradovat daný substrát, který chceme sledovat.

V našem případě byly pro inokulaci použity mikroorganismy selektované na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Jedná se o bakteriální kmen rodu *Rhodococcus erythropolis* adaptovaný pro degradaci fenolů.

7.1 *Rhodococcus erythropolis*

Buňky kmene *Rhodococcus* obsahují velké množství enzymů, které jim umožňují provádět enormní množství biokonverzí a degradací. Je schopen adaptovat se na toxické efekty a udržovat své potřebné biologické funkce, vyniká tedy svou odolností, schopností odolávat velkým změnám teploty (10 – 40 °C) a přizpůsobovat se extrémní salinitě. Díky již zmíněnému velkému množství enzymů je schopen velmi účinné biodegradace. [19]

7.1.1 Inokulace biofilmových reaktorů

Biofilmové reaktory se neinokulují užitím zmrazených mikroorganismů. Přímá inokulace způsobuje problémy s růstem, či reprodukcí nárůstu biofilmu. Mikroorganismy se z tohoto důvodu ponechávají vždy narůstat v separované nádobě a biofilmové reaktory se inokulují roztokem z nádoby až v době, kdy mikroorganismy vstoupí do exponenciální fáze růstu. [4]

8 Laboratorní model

Laboratorní model se skládal ze dvou bioreaktorů, které tvořily skleněné nádoby (5l kádinky), do každé z nich byl vložen jeden typ nosiče (AnoxKaldnes, příp. nanovláknenné nosiče). Reaktory byly umístěny ve větrané digestoři z důvodu odvodu plynů dané odpadní vody.



Obr. 8.1 Sestavení laboratorního modelu

Znečištěná odpadní voda přitéká z nátokové nádrže, přítok je realizován peristaltickým čerpadlem značky Watson Marlow v průtoku od 250 ml do 700 ml. V odpadní vodě jsou hojně zastoupeny znečišťující látky, živiny však nejsou zastoupeny v dostatečné míře.

V reaktorech dochází k hydropneumatickému míchání odpadní vody přiváděné nátokem a mikroorganismů umístěných v reaktorech. V obou reaktorech byla kultivována zmíněná bakteriální populace kmene *Rhodococcus erythropolis* (viz 7.1). *Rhodococcus erythropolis* je aerobním mikroorganismem, tudíž vyžaduje k metabolickým pochodům přísun kyslíku. Z tohoto důvodu je do reaktorového systému připojeno provzdušňovací zařízení. Pro efektivní degradační proces je nutné mikroorganismy v reaktoru rovnoměrně promíchávat. Promícháváním umožníme mikroorganismům neustálý přístup k potřebným látkám a kyslíku. Míchání provádí pro nosič AnoxKaldnes středně-bublinná aerace na dně nádrže, pro nanovláknenné nosiče je dostatečná jemně-bublinná aerace. Pokud by nebyl přiváděn dostatek kyslíku, může docházet k odumírání mikroorganismů a jejich následnému vyplavování ze systému. Z tohoto důvodu je do systému vháněn nadbytek kyslíku, který růst mikroorganismů neomezuje.

Suspenzní populace jsou promíchávány v reaktorech společně s danými nosiči biomasy. Postupem času začne povrch nosiče obrůstat biofilmem. Nosiče biofilmu byly do reaktoru vloženy tak, aby jejich objem tvořil 30 % sypného objemu reaktoru, tento objem odpovídá reálnému plnění v provozu ČOV.

Odtok se realizuje volným přepadem, který zachovává konstantní objem média v reaktoru. Další objem odtéká společně s některými mikroorganismy ze suspenze do odtokové nádrže. Odtoková nádrž je propojena stejně jako celý systém k reaktoru silikonovými hadičkami.

Nespornou výhodou laboratorního modelu biofilmového reaktoru je možnost kontroly biodegradačních procesů v něm probíhajících. Kontrola probíhá pomocí sond (pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota, vodivost) připojovaných k měřicímu přístroji WTW Multi 350i, kyvetových testů (CHSK a fenol) a analýzy stanovení nárůstu biomasy na nosiči (stanovení sušiny).

9 Užití metody měření

9.1 Stanovení CHSK

Pro laboratorní měření CHSK byly užity jednoúčelové testy COD (Chemical Oxygen Demand – výrobce Hach Lange), které jsou založeny na principu dichromanové metody. Oxidace probíhá v silně kyselém prostředí za dvouhodinového varu. Oxidovatelná složka reaguje s kyselinou sírovou, roztok dichromanu draselného reaguje v přítomnosti síranu stříbrného (Ag^+), jako katalyzátoru. Za těchto podmínek dochází k oxidaci i velmi stabilních látek. Stanovení je silně rušeno přítomností chloridů (maximální hranice koncentrace pro tyto testy je 1500 mg/l chloridů). Ionty chloridů tvoří sraženinu s katalyzátorem a také podléhají oxidaci s dichromanem, což vede k chybám ve stanovení. Jejich přítomnost je nutné ředit síranem rtuťnatým (Hg^{2+}). Redukce probíhá ve žlutém zbarvení, k vyhodnocení hodnoty CHSK je užito spektrofotometrické stanovení Cr^{6+} . Dichromanová metoda je použitelná pro sledování všech vod, tedy i odpadních. [25]

Koncentrace fenolu byla stanovována taktéž kyvetovými testy výrobce Hach Lange. [18]

9.2 Optická denzita

Rychlost růstu mikroorganismů v tekutém médiu je možné určovat optickou denzitou (absorbancí). Hodnoty optické denzity odrážejí stav bakteriálního růstu a tím umožňují reagovat na nežádoucí výkyvy v podmínkách prostředí.

Stanovení zákalu (počtu buněk) bylo prováděno stanovením zákalu pomocí spektrofotometru DR-2800 firmy Hach-Lange. Při spektrofotometrii se měří, kolik světla je absorbováno zakaleným roztokem. Měření buněčné koncentrace bylo

prováděno při vlnové délce 410 nanometrů oproti nulovacímu roztoku, v našem případě destilované vodě, a to ve skleněné kyvetě (o rozměrech 1 cm).

9.3 Stanovení sušiny

Při laboratorním stanovení sušiny byly oba nosiče nejprve řádně vysušeny dvě hodiny při 105 °C a zváženy. Biofilm byl odstraňován máčením v kyselině chromsírové (CrSO_4) po dobu 4 hodin. Sušina vázaná na nosiči je posléze stanovena jako rozdíl hmotnosti nosiče po dané době kultivace a původního nosiče omytého od biofilmu (bez bakteriální populace). [30][31]

9.4 pH

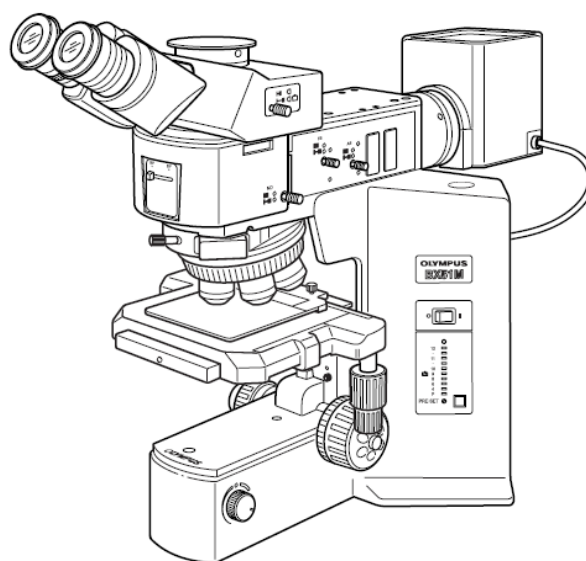
Pro měření pH v prostředí bioreaktorů byla užita kombinovaná skleněná elektroda, která je díky vlastnostem svého povrchu citlivá vůči vodíkovým iontům. Vnitřní náplň je tvořena pufrům s pH hodnotou 7. Jako referenční elektroda je užita argentochloridová srovnávací elektroda. Ponor sondy vyvolává změnu potenciálu na měřicí elektrodě v porovnání s referenční elektrodou. Obě elektrody jsou umístěny v ochranném plastovém pouzdře. Sondy byly připojeny k vyhodnocovacímu zařízení, které přepočítává změnu napětíového signálu na hodnotu pH. [26]

9.5 Konduktivita, vodivost

Vodivost je měřena metodou založenou na elektrochemickém měření odporu. Prostředkem měření je dvouelektrodová vodivostní platinová elektroda v ochranném plastovém pouzdře. Sonda měří odpor protékající vody tak, že elektrodami prochází střídavé napětí a tím způsobuje na elektrodách uspořádaný pohyb iontů. Čím větší je množství iontů v roztoku, tím větší proud protéká mezi elektrodami. Vyhodnocovací přístroj nejprve vypočte vodivost roztoku mezi elektrodami a posléze hodnotu měrné vodivosti v jednotkách mS/cm. [26]

10 Snímkování biofilmu

10.1 Mikroskop Olympus BX51M



Obr. 10.1 Mikroskop Olympus BX51M [41]

Olympus BX51M je označován jako běžný badatelský a kontrolní mikroskop, je určen pro aplikaci v materiálových vědách. BX51M nabízí osvětlení odraženým světlem. BX51M je vybaven optickou soustavou UIS (Universal Infinity System – Univerzální soustava s mezizobrazením v nekonečnu) a osvětlovacím tělesem pro odražené světlo (BX-RLA2). Toto osvětlovací těleso umožňuje pozorování odraženého světla ve světlém i tmavém poli a v polarizovaném světle. Osvětlovací systém je napájen standardně ze sítě. Osvětlení je realizováno halogenovou žárovkou s nastavitelnou intenzitou osvětlení. [41][42]

Mikroskop je v našem případě vybaven pěti polohovým revolverovým nosičem objektivů s objektivy s 5, 10, 20, 50 a 100 násobným zvětšením, celkové zvětšení mikroskopu je 50, 100, 200, 500 a 1000násobné.

10.2 Fotoaparát Olympus E-510

Olympus E-510 je digitální „zrcadlovka“, jejíž plné rozlišení je 10,9 megapixelu. Je vybavena vestavěným stabilizátorem obrazu, třemi způsoby zaostřování a šesti expozičními režimy. Nový výkonný obrazový procesor zajišťuje redukci šumu, fotky jsou čistší a věrnější. Speciální protiprachový filtr Supersonic Wave Filter chrání obrazový snímač E-510 proti usazování částic prachu. [43]

Při laboratorním snímkování byl z nabízených expozičních režimů použit režim „P“, který označuje „Programové snímání“. V režimu „P“ je fotoaparát naprogramován tak, že se hodnota clony a expoziční doba volí automaticky podle jasu předmětu. [44]

10.3 QuickPHOTO MICRO 2.3

QuickPHOTO MICRO 2.3 je určený k získávání digitálního obrazu z mikroskopů, které jsou vybaveny digitálními fotoaparáty. Program umožňuje úpravu, ukládání pořízených snímků a měření. QuickPHOTO umožňuje sledování živého obrazu z mikroskopu na monitoru PC a tím usnadňuje ostření a exponování snímku. Program dále obsahuje tyto funkce: měření v obraze, vkládání kalibrovaného měřítka, automatické vytváření tabulky naměřených hodnot, práce s více snímky, vyznačování zajímavých detailů, vkládání popisků, automatické pořizování snímků v definovaném časovém intervalu, možnost rozšíření pomocí přídatných modulů (Deep Focus). [45][46]

10.4 Deep Focus 3.1

Deep Focus 3.1 je přídatný modul programu QuickPHOTO MICRO 2.3 pro vytváření snímků s extrémní hloubkou ostrosti, kterých dosahuje efektivním skládacím algoritmem. Vytvořená hloubka je mnohem větší, než jsme schopni vytvořit pomocí optických mikroskopů.

Principem algoritmu je skládání ostrých oblastí z nasnímaných „řezů“ se standardní hloubkou ostrosti a různou rovinou zaostření, ze kterých je složen výsledný kompletně proostřený snímek. [47]

Praktická část – výsledky a jejich diskuze

11 Reálná degradace látek v odpadní vodě

Cílem laboratorního testování degradace odpadních látek je simulace podmínek reálného provozu na čistírně odpadních vod za využití identického druhu degradujících mikroorganismů a obdobného sestavení systému. Sledovanými parametry laboratorních reaktorů jsou ty mající vliv na stav populace mikroorganismů v reaktoru a jejich schopnost degradovat nežádoucí látky v odpadní vodě. V reaktoru jsou prováděny zátěžové testy a sleduje se, jak se na ně mikroorganismy adaptují. Schopnost degradace mikroorganismů v reaktorech je hodnocena měřením hodnot koncentrace fenolu a chemické spotřeby kyslíku (CHSK). Růst mikroorganismů je sledován optickou denzitou, stanovením sušiny a také obrazovou analýzou.

11.1 Provoz modelů

Modely bioreaktorů jsou provozovány kontinuální kultivací, která simuluje praktické užití. Model je však na počátku experimentu provozován jako vsádkový (batch) test, při němž jsou do dvou různých reaktorů inokulovány zvolené organismy (*Rhodococcus erythropolis*). Jeden reaktor obsahuje fluidní lože (AnoxKaldnes) a druhý fixní lože (nosná nit s nánosem nanovláknů). Suspenze mikroorganismů je adaptována na daný kontaminant, v našem případě je zdrojem kontaminace fenol. Po dobu prvních dvou týdnů je suspenze přiživována fenolem a nutriety (fosfáty aj.). Množství (koncentrace) fenolu je v průběhu času navyšováno. Vyšší koncentrace je dávkována vždy, když předchozí dávka koncentrace klesne na určitou mez. Takové dávkování umožňuje dostatečnou adaptaci mikroorganismů na následnou degradaci reálné odpadní vody. Díky adaptaci se mikroorganismy rychleji rozmnožují a tím navyšují svůj objem.

Po dostatečné adaptaci mikroorganismů se přechází do kontinuálního provozu reaktoru (řízené dávkování substrátu). Na počátku kontinuálního provozu je snahou udržovat optimální růst mikroorganismů. Kontinuální přítok začal v době, kdy je kultura neaktivnější (v exponenciální fázi růstu). Živiny jsou při kontinuální kultivaci přidávány do nátokové nádrže uměle (200 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 60 mg/l K_2HPO_4).

Exponenciální fázi růstu naznačují některé parametry reaktoru – nízká hodnota CHSK a rostoucí hodnota optické denzity. Na počátku kontinuálního provozu reaktoru je udržován nízký průtok (vysoká doba zdržení – 12 dnů), protože je nutné

mikroorganismům umožnit adaptaci na nové podmínky, zejména na vysokou koncentraci solí. S průběhem kontinuálního provozu se průtok zvyšuje, doba zdržení se snižuje až k 4,2 dnům.

11.2 Doba zdržení

Kontinuální provoz reaktoru je charakteristický nepřetržitým přítokem substrátu. Hodnota průtoku je kontrolovanou vstupní proměnnou v biofilmových reaktorech, její nastavení se provádí kalibrací čerpadel a to měřením čerpaného objemu za určitý čas.

Doba zdržení je definována jako poměr objemu reaktoru k přítoku odpadní vody, v našem případě definuje a udává čas, za který se vymění celý objem reaktoru. Nejčastěji je vyjadřována v jednotce [den]. Doba zdržení je faktorem kontinuálního provozu a může dosahovat dvou opačných kritických hodnot. Nízká doba zdržení je charakteristická poklesem biomasy v reaktoru ať vyplavováním, či toxickým šokem v důsledku velkého přítoku kontaminované vody. Vysoká doba zdržení způsobuje nedostatek živin v reaktoru, který zpomaluje růst mikroorganismů. V laboratorním provozu je snaha o konstantní přítok substrátu a odtok části buněk s médiem stejnou rychlostí. Tímto způsobem je přiváděn dostatek živin a je zamezeno toxickému šoku. Cílem je maximalizovat přítok čištěné odpadní vody s ohledem na reálné požadavky čistíren odpadních vod (maximalizovat výkon bioreaktorů). [24]

Průtok je při počátečním zapracování mikroorganismů velmi nízký a je zvýšen až při dostatečném odbourání kontaminace v reaktoru – dostatečné adaptaci mikroorganismů.

Přítok substrátu se v laboratorních modelech pohybuje od 250 ml/den do 700 ml/den. Doba zdržení se pro reaktory o objemech 3 litry pohybuje od 12 dní do 4,2 dne.

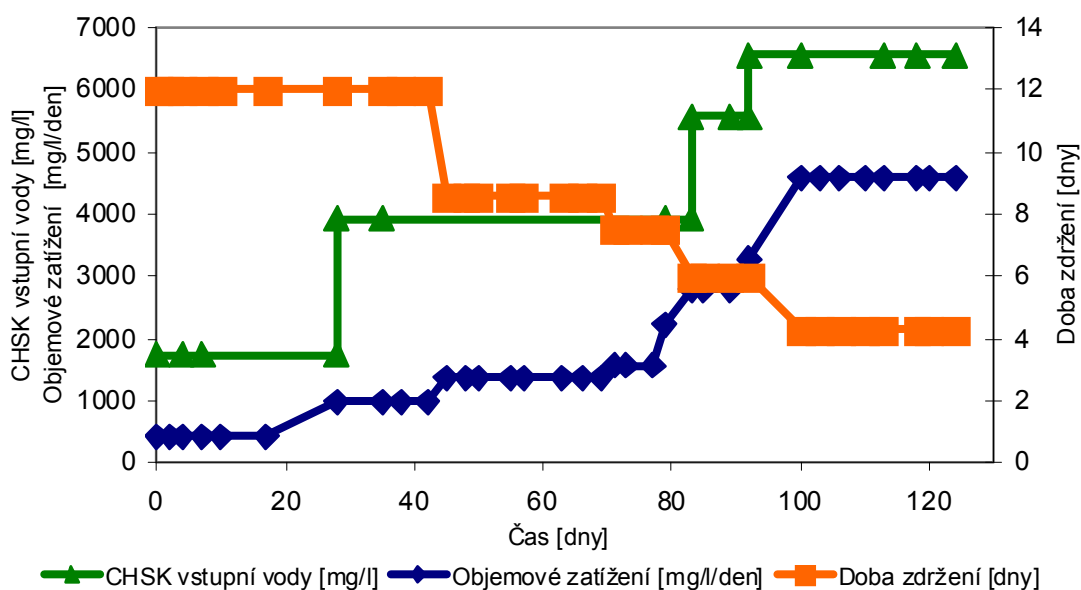
11.3 Objemové zatížení

Součinem parametrů průtoku reaktoru za den [ml/den] a hodnoty CHSK vody přitékající do reaktoru [mg/l] určujeme veličinu nazývanou objemové zatížení (mg/l/den). Voda přitékající do reaktoru by v našem případě měla mít postupně zvyšující se objemové zatížení (s cílem určit maximální výkon, zatížení reaktorů). Při výrazných změnách hodnoty CHSK je vhodné korigovat přítok vody do reaktoru. Snažíme se dosáhnout maximálního přítoku dle přípustného objemového zatížení

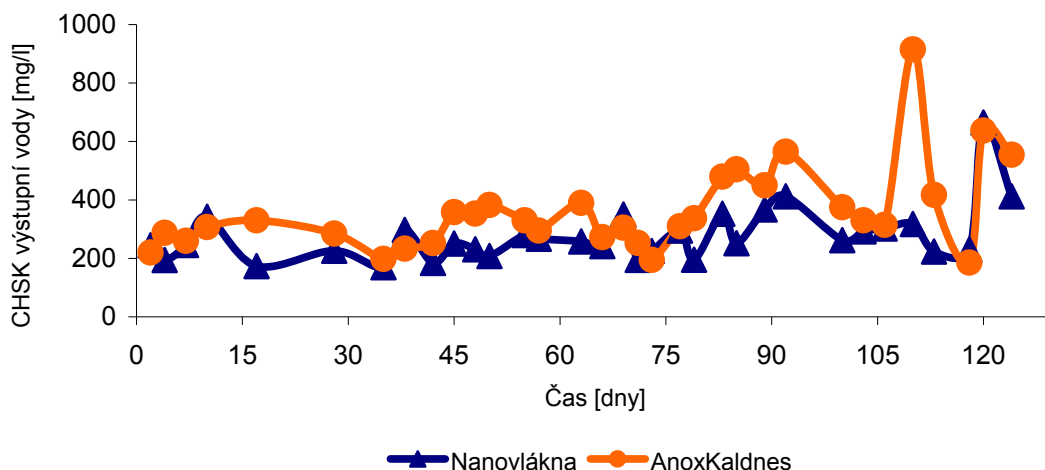
takového, které jsou mikroorganismy schopny degradovat, abychom dosáhli minimální znečištění na odtoku.

11.4 CHSK

Oba reaktory (odlišné pouze typem nosiče) byly provozovány za stejných podmínek: CHSK, doba zdržení a objemové zatížení jsou znázorněny v grafu níže. Výstupní CHSK bioreaktorů s AnoxKaldnes a nanovláknny dosahovaly téměř shodných hodnot, nanovláknenné nosiče však po celou dobu vykazovaly průměrně mírně lepší výsledky.

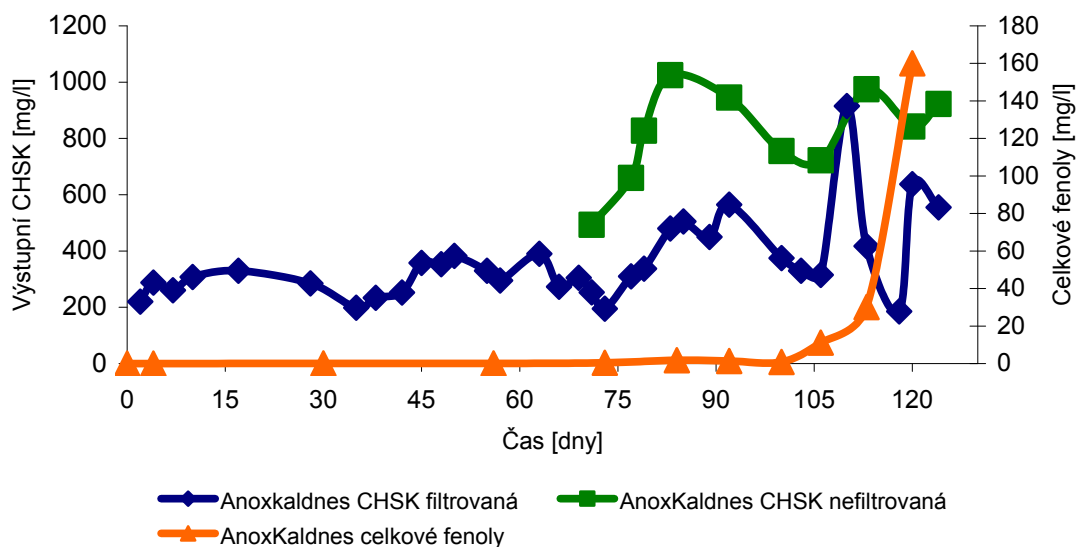


Obr. 11.1 Vstupní parametry reaktorů

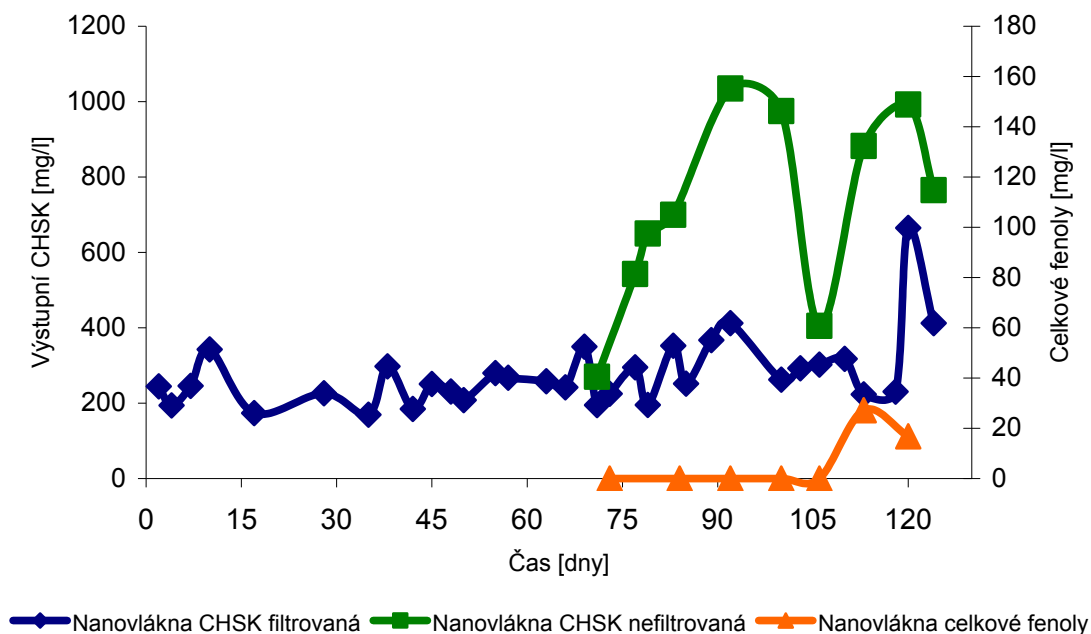


Obr. 11.2 Výstupní CHSK reaktorů

Hodnoty filtrované a nefiltrované CHSK jsou velmi podobné, avšak hodnoty celkových fenolů dokládají výrazný rozdíl v dosažení odstranění kontaminace. Ke konci experimentu dosáhly celkové fenoly pro technologii AnoxKaldnes k hodnotě 160 mg/l, kdežto pro technologii nanovláknových nosičů 30 mg/l. Důvodem „kolapsu“ systému v závěru experimentu může být synergický efekt působení teploty (8 °C), velmi nízké doby zdržení (4,2 dny) a vysokého objemového zatížení (6 550 mg/l). Při dlouhodobém provozu laboratorních experimentů docházelo k záměrnému modelování kritických podmínek, jejichž cílem bylo nalezení limitních stavů reaktorů. [18]



Obr. 11.3 Výstupní parametry reaktoru s AnoxKaldnes



Obr. 11.4 Výstupní parametry reaktoru s nanovláknky

11.5 Kyslík a respirace

Pro průběh aerobních procesů je potřebné zajistit dostatečný přísun kyslíku. Optimální poměr je takový, že rychlost přísunu kyslíku je větší, nebo rovna rychlosti jeho spotřeby. [27]

Respirace se týká aktivity směsi živých kultur mikroorganismů a odpadní vody (substrátu) a stanovení nároků biomasy na množství kyslíku rozpuštěného ve vodě. Respirace je vyjádřením biologické potřeby mikroorganismů pro jejich metabolismus, jehož pomocí dochází k degradaci kontaminantu. Výstupem měření respirace je určení aktivity mikroorganismů. [29]

Měření respirace se provádí v tzv. respiometrické cele, v níž je zabráněno přístupu vzduchu k hladině biologické směsi. V průběhu měření se střídají periody provzdušňování a měření spotřeby kyslíku. Provzdušňování je prováděno ponorným aerátorem a směs je nasycena rozpuštěným kyslíkem na koncentraci okolo 8 mg/l. Prvním provzdušněním je do směsi přivedeno dostatečné množství kyslíku. Poté dojde k nadávkování fenolu o koncentraci 2 mg/l. Cela se uzavře, utěsní, tak aby se zabránilo přístupu vzduchu z okolí. V okamžiku uzavření se začne spotřebovávat kyslík a jeho klesající hodnota je zaznamenávána měřicím přístrojem z kyslíkové sondy vnořené do směsi a utěsněné v respiometrické cele. Kyslík v cele se začne spotřebovávat a je zaznamenáván v závislosti na čase až do doby, kdy poklesne

pod hodnotu koncentrace kyslíku okolo 2 mg/l. Poté následuje nová etapa aerace a celý cyklus je několikrát opakován, než dojde ke zlomu, který indikuje odstranění substrátu.

Laboratorní stanovení respirace probíhalo v jedno-litrové nádobě plnící funkci respirometrické cely. Do nádoby bylo přidáno 41 nosičů AnoxKaldnes a 112 nití s nanovláknem o celkové délce 22,4 metrů. Do příslušné respirometrické cely byl, či nebyl přidán daný typ dispergované bakteriální suspenze (viz Tab. 11.2).

11.5.1 Vyhodnocení laboratorních respiračních testů

Laboratorní respirační testy byly prováděny jako kinetické testy s biomasou a nosiči a probíhaly za stálé laboratorní teploty. Cílem série testů je vyjádření specifické respirační rychlosti, která připadá na biomasu fixovanou na nosičích. Záměrem je určení aktivity dispergovaných mikroorganismů, sušiny a porovnání aktivity mikroorganismů fixovaných na AnoxKaldnes a nanovláknenných nosičích. Tedy orientační stanovení rozdílu připadající jen na biofilm na nosiči po odečtení rychlosti získané v samotné suspenzi k zabíranému objemu. Na obrázku jsou zobrazeny experimenty s plastovými nosiči a vpravo s nanovláknennými nosiči. [29]



Obr. 11.5 Respirometrická cela – komerční a nanovláknenné nosiče

Tab. 11.1 Hodnoty sušiny (113. den provozu)

<i>Voda</i>	objem vody [ml]	průměr NL ve vodě [g]	celkové NL ve vodě (objem vody = 1 l) [g/l]
<i>ANOX</i>	20	0,2150	10,75
<i>NANO</i>	20	0,3900	19,50
<i>Nosiče</i>	počet nosičů	průměr sušiny na nosiči [g]	celková sušina na nosičích [g/l]
<i>ANOX</i>	41	0,0188	0,7700
<i>NANO</i>	112	0,0053	0,5936

Následující tabulka ukazuje vypočtené respirační rychlosti pro různá plnění:

Tab. 11.2 Vypočtené respirační rychlosti (113. den provozu)

Podmínky experimentu	X	rV, H, max
	[g/l]	[mg/(l.hod)]
30% nosič NANO + 70% vodaNANO	20,09	762,55
		762,55
30% nosič ANOX + 70% vodaANOX	11,52	360,00
		360,00
30% NANO (+DV)	0,59	480,61
		480,61
30% ANOX (+DV)	0,77	221,10
		221,10
100% vodaNANO	19,50	281,93
		281,93
100% vodaANOX	10,75	138,90
		138,90

Pro stanovení technologických parametrů je rozhodující objemová respirační rychlost, která vyjadřuje spotřebu výsledné náplně bioreaktoru bez nutnosti rozlišovat podíly vlivu jednotlivých složek. Sledujeme, jak se chová náplň bioreaktoru jako celek, a nerozlišujeme, co způsobuje pouze biomasa na nosiči. Není záměrem sledovat biologické procesy, ale celkovou aktivitu náplně bioreaktoru. Z tohoto důvodu se respirační aktivita přepočítá na 1 g nerozpuštěných látek (NL). Maximální respirační rychlost je vztažena na nerozpuštěné látky, eliminace na biomasu ztrátou žíhání prováděna nebyla. Odpadní vody v experimentech obsahovaly vysokou dávku nerozpuštěných látek. Z důvodu zatížení odpadní vody nerozpuštěnými látkami dosahují respirace nízkých rychlostí, protože obsah aktivní biomasy ve stanovované sušině je nízký. Cílem měření je nalézt maximum objemové respirace. [29]

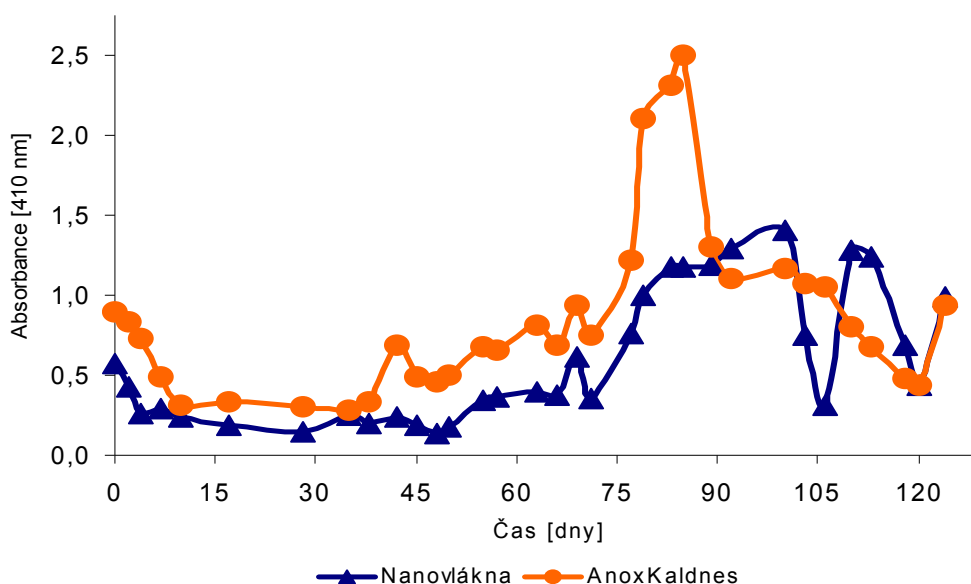
Z naměřených hodnot je zřejmé, že respirace nejrychleji probíhala při testech s biomasou fixovanou na nanovláknenných nosičích, téměř dvakrát rychleji než při testu s nosiči AnoxKaldnes. Z výsledků je patrné zvýšení respirační rychlosti u testů média s nosiči. Je zřejmé, že hodnota maximální respirační rychlosti značně vzrostla pro test s přidáním nanovláken.

11.6 Optická denzita

V laboratorním modelu biodegradace je koncentrace biomasy v kultivačním médiu nestálá. Nestálost je důsledkem kontinuálního provozu systému, ve kterém se mikroorganismy neustále přizpůsobují měnícím se podmínkám prostředí. Pokud mají mikroorganismy dostatek živných látek, začnou se množit. Množení pokračuje až do doby, kdy přestanou mít vhodné podmínky. Takovýto růst se označuje jako exponenciální (logaritmický). Růst mikroorganismů zvyšuje zakalení a způsobuje změny v prostředí (klesá koncentrace živin).

Při kultivaci dochází také k přirozenému odumírání mikroorganismů jak stářím, tak z důvodu extrémních výkyvů v prostředí. Extrémní výkyvy jsou takové stavy, ve kterých nejsou mikroorganismy schopny přežít a dojde tak k zastavení degradace látek. Doba předcházející kolapsu systému před extrémním stavem je nazývána maximálním limitním zatížením.

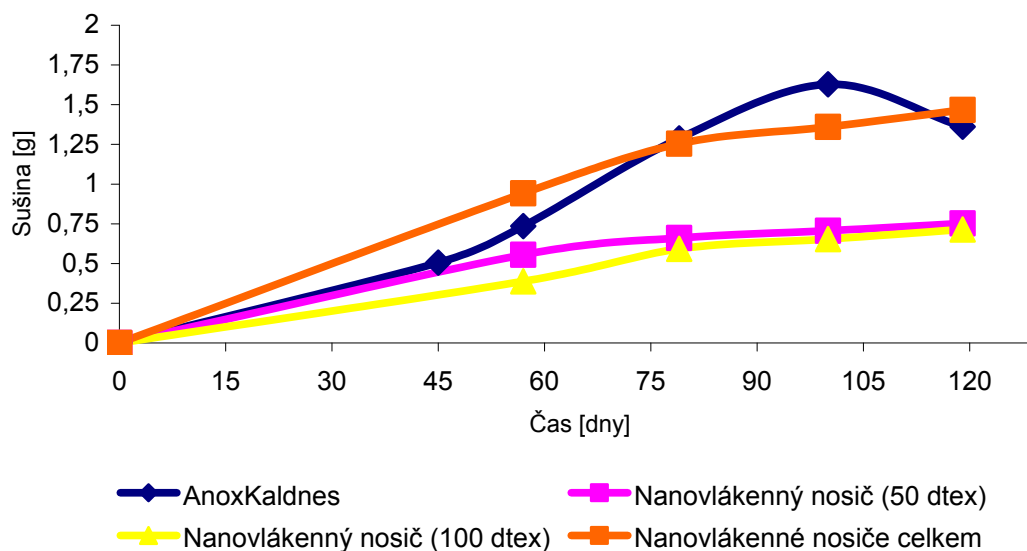
Z naměřených dat absorbance byl vynesena graf níže. Z grafu je zřejmé, že nanovláknenné nosiče mají nižší absorbanci, která potvrzuje lepší zapracování a kolonizaci nosiče, tím i vyšší aktivitu mikroorganismů vázaných na nosič, a to ve formě biofilmu.



Obr. 11.6 Absorbance reaktorů

11.6.1 Stanovení sušiny

Nosiče vložené na počátku experimentu do reaktorů byly zcela původní, bez předchozí kolonizace, proto křivka sušiny v grafu probíhá od nulových hodnot.



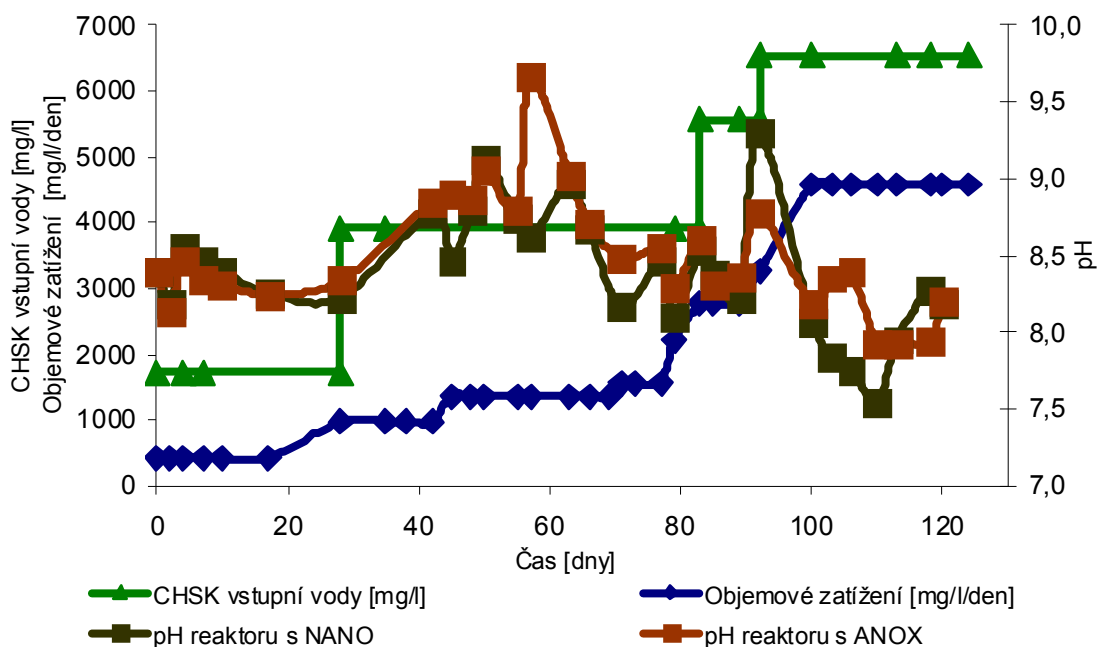
Obr. 11.7 Trend nárůstu biomasy na nosiči

Oba nosiče lze porovnat dle doby, po kterou trvá nárůst daného množství biomasy. Z grafu je zřejmé, že biomasa na nanovláknenném nosiči narůstá téměř 2x rychleji, zejména v počátečních fázích kolonizace. Tím se potvrzuje domněnka, že biomasa se bude tvořit na nanovláknenném nosiči rychleji, protože na rozdíl od nosiče AnoxKaldnes nemusí mikroorganismy pro přichycení na nosiči narušovat jeho povrch. Růst biomasy přirozeně nepokračuje donekonečna, růst se ustálí na konečné hodnotě, která je dána užitou technologií.

11.7 pH

Velké skokové změny pH mohou narušovat optimální podmínky v reaktorech a tím inhibovat mikrobiální aktivitu. Inhibicí se prodlužuje doba, po kterou se mikroorganismy adaptují, než se stanou opět aktivními. V bioreaktorech se hodnota pH pohybovala v rozmezí 7,5 až 9,3.

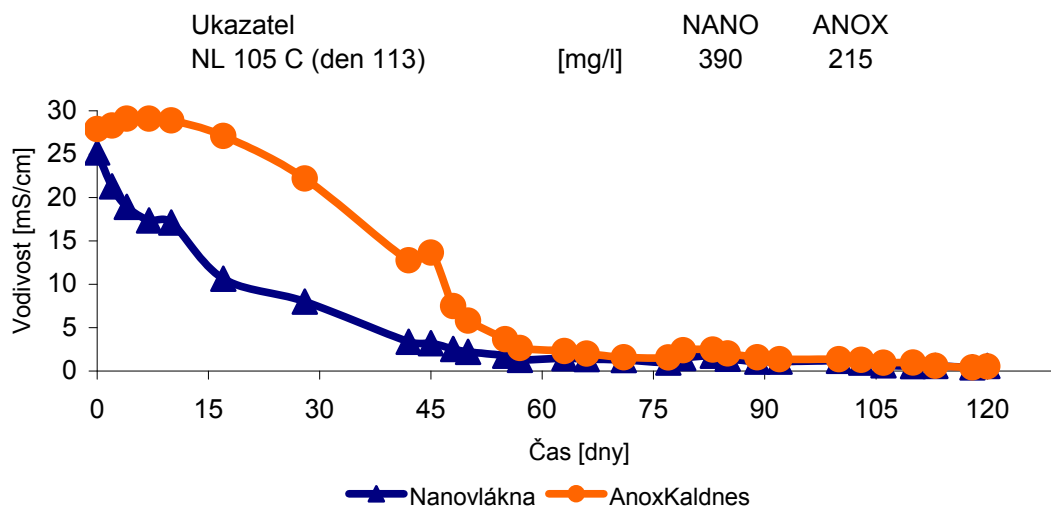
Z naměřených hodnot pH byl vynesena graf níže. Z průběhu grafu je zřetelné, že nanovláknenné nosiče neovlivňují hodnotu pH. Pro porovnání je podmiňující shodné objemové zatížení, které bylo splněno, neboť oba reaktory byly provozovány za stejných podmínek.



Obr. 11.8 Znázornění vývoje pH

11.8 Konduktivita, vodivost

Měření vodivosti může být rušeno nerozpuštěnými látkami. V tabulce níže jsou uvedeny jejich hodnoty pro reaktory s nanovláknem a AnoxKaldnes.

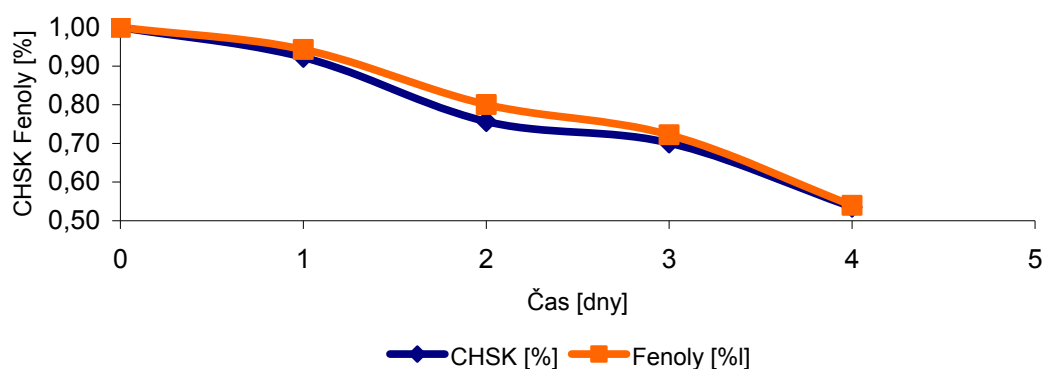


Obr. 11.9 Vývoj trendu vodivosti

Vysoká salinita ovlivňuje počáteční kolonizaci mikroorganismů. Soli jsou typické vysokou adhezí k povrchu nosiče. Na solných vrstvách na povrchu nosičů se mikroorganismy již vyskytují, mají vyšší adhezi k soli než k povrchu nosiče. Kolonizují nejprve povrch soli a poté se dále rozšiřují na povrch nosiče. Z tohoto důvodu je výhodnější užití nanovláknenného nosiče, kde mikroorganismy nemusí čekat na vytvoření solných krystalů a mohou kolonizovat přímo nanovrstvu. Vliv vysoké salinity je částečně možné eliminovat doplňováním odparu vody odstátou vodou (bez obsahu volného chlóru).

11.9 Proces těkání

Vháněním vzduchu (přísunem kyslíku) do systému biodegradace se zvyšuje možnost odparu některých lehce těkajících odpadních látek, takové látky se dříve odpaří, než jsou degradovány. Proces těkání je značně ovlivněn teplotou (v našem případě 22 °C). Modelová situace těkání je zobrazena na grafu níže.



Obr. 11.10 Proces těkání kontaminantů z reálné odpadní vody

Při kontinuální kultivaci v laboratorním experimentu se doba zdržení postupně snižuje z 12 až na 4,2 dní. Z grafu výše (Obr. 11.10) je patrná možnost toho, že těkavé látky znečišťující odpadní vodu vytékají dříve, než dojde k jejich odstranění biodegradací.

12 Obrazová analýza biofilmu

12.1 Snímkování

Snímkování bylo prováděno v laboratoři na mikroskopu Olympus BX51M, pro dodatečné osvětlení vzorku byla použita lampa přídavného osvětlení značky KRÜSS. Získávání snímků probíhalo za pomoci programu QuickPHOTO MICRO 2.3, jejich ostrost byla zajištěna použitím přídavného modulu Deep Focus 3. 1. [48]

Ostré snímky pro obrazovou analýzu vznikaly snímáním celé série snímků, které byly zpracovány a složeny pomocí algoritmu programu Deep Focus. Proostřování celého objektu v jednotlivých vrstvách je nutné, protože mikroskop má velice nízkou hloubku ostrosti. [48]

12.2 Obrazové hodnocení biofilmu

Nejnovějším trendem v hodnocení bakteriálního biofilmu je užití obrazové analýzy mikroskopických snímků. Pro hodnocení biofilmu se běžně užívá více metod (ultrazvukové stažení biofilmu, nebo stanovení sušiny na nosiči). Uvedené metody patří mezi tzv. invazivní (dochází při nich k destrukci biofilmu a/nebo destrukci samotného nosiče). Z tohoto důvodu je vhodné zvolit a užít tzv. neinvazivní metodu, v našem případě je zvolena metoda hodnocení bakteriálního růstu pomocí obrazové analýzy. Největší výhodou obrazové analýzy je její rychlost, objektivní hodnocení, efektivita při zpracování velkého množství dat, také nevyžaduje větší zkušenosti s analytickými postupy a neničí mikroorganismy ani nosič (umožňuje jeho opakované použití). [40][48]

V obrazové analýze biofilmu je snahou definovat a užívat nejjednodušší postup stanovení především plošného zaplnění, které je vyjádřením míry kolonizace nosiče biofilmem. Obrazová analýza však přináší i komplikace, zejména její správné kvalitativní a kvantitativní vyjádření. Proto, abychom mohli obrazovou analýzu prohlásit za korektní, je nutné ji předtím testovat na mnoha sadách zkušebních snímků. V našem případě je testovací sada snímků získána mikroskopickým snímkováním nosičů v průběhu celé kultivace mikroorganismů. Cílem testování korektnosti obrazové analýzy je možnost užití této metody k odhadu a určení kinetiky růstu bakteriální populace na určitých typech nosičů. [48]

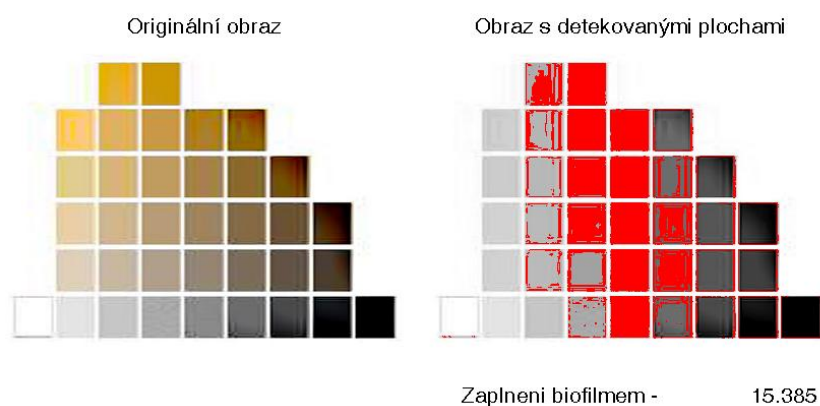
Obrazová analýza má za cíl definovat parametry, které vhodně zachycují a interpretují požadovanou charakteristiku biofilmu. V našem případě je pro sledování kinetiky bakteriální populace na daném povrchu nosičů zvolen parametr „plošné zaplnění“. Plošné zaplnění je jednoduše definováno jako poměr plochy nosiče obsazené biofilmem k celkové ploše nosiče na snímku. Pro efektivní hodnocení kinetiky nárůstu biofilmu na nosiči je však nutné pokusit se zachytit plošné, tak i objemové zaplnění, jinak bychom zanedbávali prostorový efekt nárůstu biofilmu. Prostorovým nárůstem biofilmu je míněn nárůst mikroorganismů směrem od nosiče. Prostorové hodnocení je však zatíženo chybou, a to takovou, že k snímkování není k dispozici mikroskop umožňující zachycení jednotlivých vrstev nárůstu (osu z) například pomocí tzv. konfokální mikroskopie. Cílem je charakterizovat bakteriální biofilm neinvazivní metodou tak, aby výsledky měly stejnou vypovídací schopnost s výstupy, které získáváme standardními invazivními metodami. [48]

12.3 Princip starého obrazového hodnocení

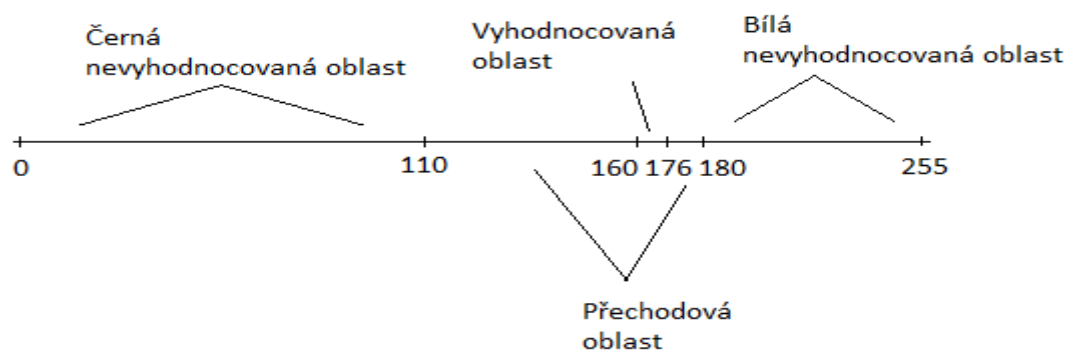
Vstupní snímek je předzpracováván v externím grafickém programu (například Photoshop) pomocí sestavených maker – ostření, korekce jasu, kontrastu, úprava histogramu, barev, vyvážení bílé.

Snímek je transformován z barevné bitmapy (RGB) na šedotónový obraz s hodnotami v rozmezí 0 až 255. Na základě předchozího zkoumání a vytvoření kalibrace (Obr. 12.1) pomocí snímků škály barev byla určena tato rozmezí matice (Obr. 12.1, Obr. 12.2) [48]:

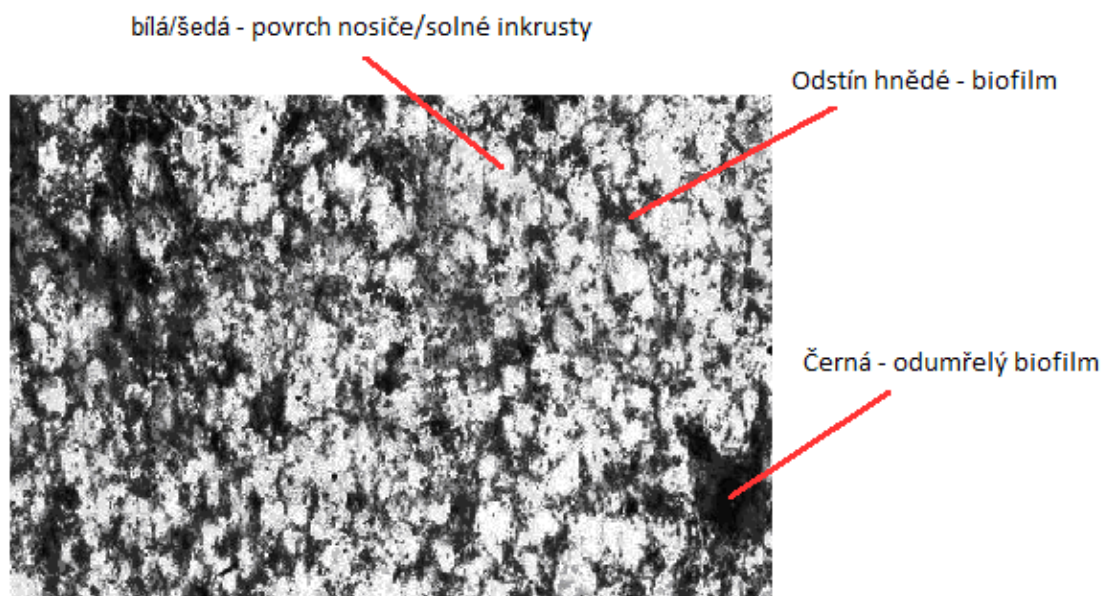
- 1) vyhodnocované – pokrytí biofilmem
- 2) nevyhodnocované
 - a) přechodové oblasti – přechod mezi biofilmem a nevyhodnocovaným pozadím
 - b) pozadí – nosič, solné krystaly



Obr. 12.1 Kalibrace snímků škály barev [48]



Obr. 12.2 Rozmezí matice a vyhodnocovaná oblast [48]



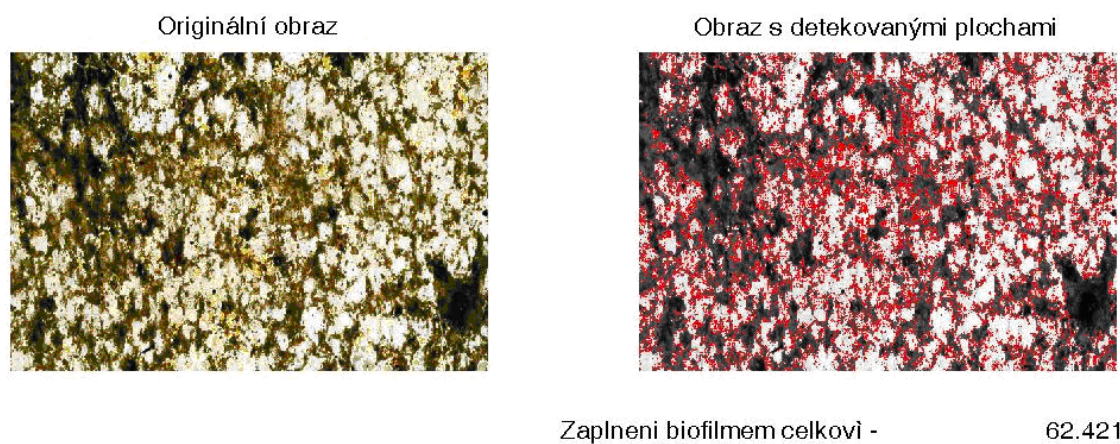
Obr. 12.3 Vyhodnocované rozmezí biofilmu [48]

Průchodem matice se vypočte počet pixelů, které jsou ve vyhodnocovaném rozmezí, posléze se vypočte plocha zaplnění biofilmem.

Vyhodnocovaný snímek je nejprve zkomprimován, především pro jeho rychlejší zpracování, ale i přesto jeho vyhodnocení v prostředí Matlab trvá několik jednotek minut (vysoká náročnost na paměť), důvodem je pomalé zpracování grafických dat (samozřejmě se čas odvíjí od použitého hardwarového vybavení).

Poměrem plochy zaplněné a celkové se vypočte zaplnění snímku biofilmem v procentech. Po vypočtení zaplnění je do snímku zvýrazněna celá plocha výskytu biofilmu, především pro optickou kontrolu správnosti algoritmu.

Je vytvořen srovnávací list (Obr. 12.4) – původní, vyhodnocený snímek a údaje o jeho zaplnění).



Obr. 12.4 Srovnávací list zaplnění biofilmem [48]

12.4 Princip nového obrazového hodnocení

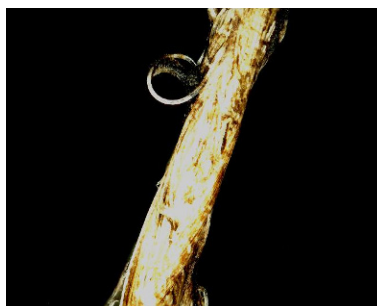
Smyslem vývoje nového kódu pro obrazové hodnocení biofilmu je nahrazení dříve užívaného vyhodnocovacího postupu, který byl založen na předchozí korekci barev a následném prahování. Snahou je pomocí nového programového kódu vyhodnotit mikroskopické snímky nosičů užitých v laboratorním provozu biofilmových reaktorů.

Výstupem obrazové analýzy je stanovení nárůstu kolonií na nosičích (obsazení povrchu nosiče) spojené s následným vyhodnocením snímků vzhledem k typu nosiče a jeho vlastnostem. Po získání dat o obsazenosti nosičů během kultivace došlo k porovnání a korekci s hodnotami sušiny. Cílem tohoto porovnání je poskytnout základ hodnocení objemu biofilmu narostlého směrem od nosiče, které prozatím nebylo k dispozici.

V obrazové analýze nejprve dochází k rozčlenění obrazu na místa zájmu (plocha s biofilmem) a ostatní (pozadí, povrch nosiče). Pro jednoznačnou identifikaci je potřebné vhodně zkombinovat jednotlivé složky. Přirozené zabarvení bakteriálního biofilmu lze ovlivnit pouze na mikroskopickém obraze, zejména užitím správného nastavení mikroskopu. Výsledkem mikroskopického pozorování jsou snímky, ve kterých černá odpovídá pozadí (pro analýzu nepodstatné), odstíny bílé až šedé odpovídají povrchu nosiče a odstíny žluté až hnědé odpovídají mikrobiálnímu biofilmu. Principem programu je rozpoznat zřejmé vizuální rozdíly barevného zastoupení, pokud ignorujeme jejich jas.

12.5 Popis nového obrazového hodnocení

Programové hodnocení biofilmu začíná načtením nejvhodnějšího snímku nosiče získaného z mikroskopického snímkování. V programovém prostředí specifikujeme, z jaké složky a jaký typ souboru načítáme. Prostředek tak umožňuje dávkové zpracování snímků. Posléze specifikujeme typ nosiče, datum jeho odběru, a při jakém zvětšení snímek vznikl.

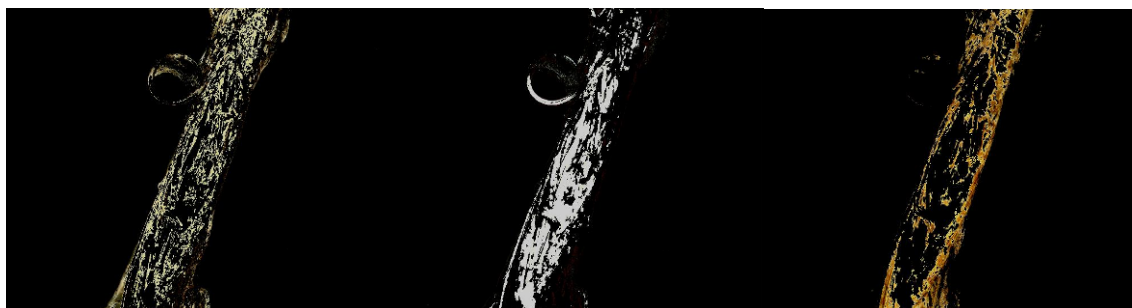


Obr. 12.5 Snímek nosiče s biofilmem – vstupní snímek

Načtený vstupní snímek je zkomprimován (do rozlišení 600 na 400), zejména pro urychlení jeho zpracování. Posléze je u snímku upraven kontrast a jas. Dalším krokem je rozčlenění (segmentace) barev v obraze. Obraz v RGB je převeden do jiného barevného prostoru ($L^*a^*b^*$), tím dosáhneme absolutního vyjádření barev nezávisle na zařízení. Ve vstupním snímku jsou tři základní i pouhým pohledem rozeznatelné barvy: bílá až šedá – nosič, černá – pozadí a žlutá až hnědá – biofilm. Barevný prostor $L^*a^*b^*$ umožňuje hodnotit takové vizuální rozdíly. Hodnocení je možné díky tomu, že veškeré informace o barvě jsou ve složkách 'a*' a 'b*'. Rozdíl mezi dvěma barvami je možné měřit pomocí Euklidovské vzdálenosti. Takové hodnocení není v RGB možné.

Informace o barvě se nacházejí v 'a*b*' prostoru, proto je v něm prováděno oddělení jednotlivých barevných ploch shlukovacím (clustering) algoritmem K-Means,

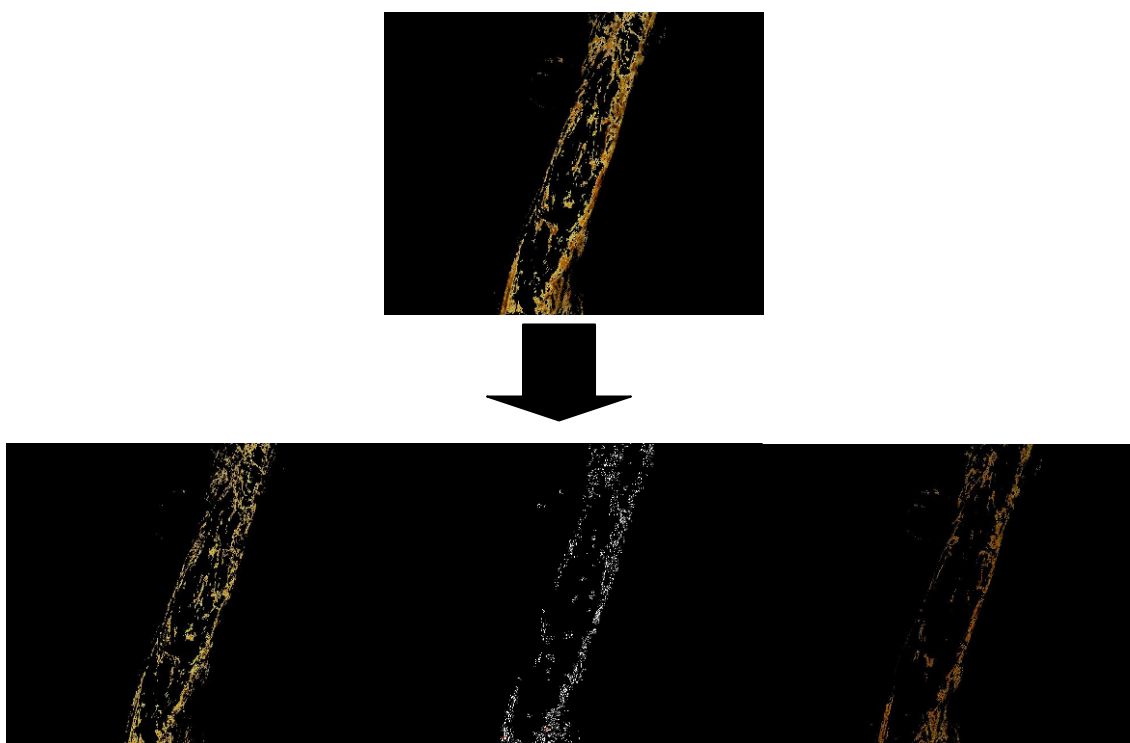
kterým jsou objekty seskupeny do zadaného počtu shluků užitím Euklidovské vzdálenosti. Shlukování každému objektu přiřazuje jeho místo v prostoru a index odpovídající shluku, ke kterému objekt náleží. Tímto způsobem lze vytvořit jednotlivé snímky, které rozdělují vstupní obraz dle barev. V našem případě je zvolena segmentace dle tří barev, tedy do tří shluků. Zadaný počet shluků (barev), do kterých chceme vstupní snímek dělit, je výsledkem předchozího testování algoritmu. Testováním bylo zjištěno, že dělení snímku do více barev (shluků) je segmentace časově i výpočetně náročnější, ale především dochází k další nepotřebné segmentaci barevné oblasti, která reprezentuje na snímku biofilm, tudíž dochází ke zmenšování reálné oblasti, kterou na snímku zabírá. Na obrázcích níže jsou vyobrazeny segmentované shluky. První snímek reprezentuje reziduum tmavých odstínů, které splývají s pozadím, prostřední snímek je segmentovaný shluk reprezentující povrch nosiče, který není obsazen biofilmem, a poslední snímek reprezentuje nárost biofilmu na nosiči.



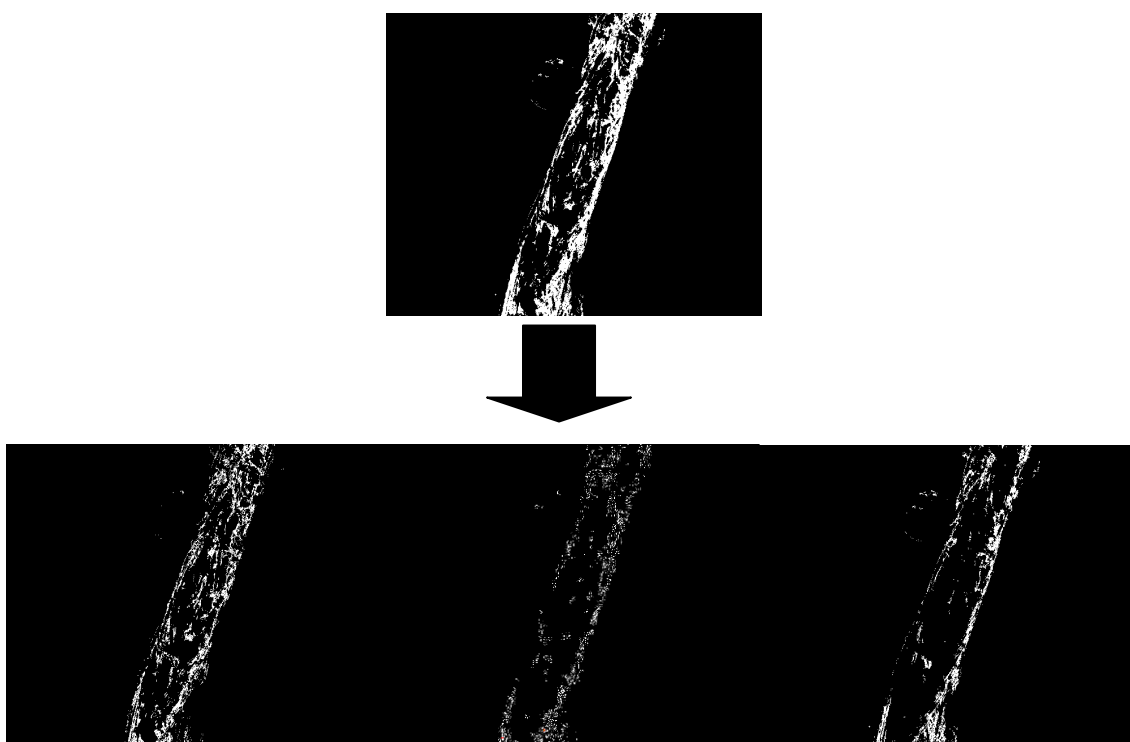
Obr. 12.6 Segmentace vstupního snímku do tří barev

Následně je nezbytné zjistit, který shluk obsahuje bakteriální biofilm, protože algoritmus K-Means vždy vygeneruje segmentované shluky v jiném pořadí. Hledání shluku s biofilmem se provádí pomocí jasové složky 'L*' pixelů ve shluku a hodnot 'a*' a 'b*', které mají specifické hodnoty pro každý shluk.

V nalezeném shluku s biofilmem lze vizuálně snadno rozlišit světlé, střední (přechodové) a tmavé oblasti (Obr. 12.7 a Obr. 12.8). Různě barevné plochy ve shluku s biofilmem jsou způsobeny tím, že čím vyšší je vrstva narostlého biofilmu na nosiči, tím tmavší je jeho barva. Shluk s biofilmem rozdělíme prahováním například na tři charakteristické odstíny: světlý, střední a tmavý. Jak je patrné ze snímků z prahování (Obr. 12.7 a Obr. 12.8), plocha nosiče, která je zaplněna „středním“ biofilmem, je minimální, protože reprezentuje přechodovou vrstvu mezi světlým a tmavým biofilmem.

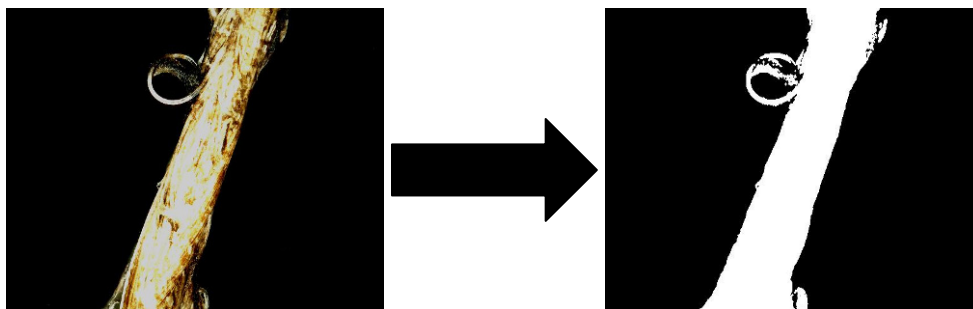


Obr. 12.7 Segmentace snímku s biofilmem na světlý, střední a tmavý



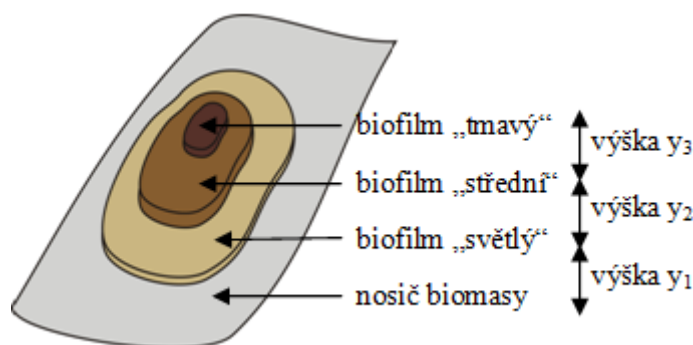
Obr. 12.8 Segmentace snímku s biofilmem na světlý, střední a tmavý (snímky převedeny do černobílé pro lepší přehlednost)

Pro výpočet obsazení nosiče biofilmem je nezbytné vypočítat plochu, kterou na snímku zabírá samotný nosič. V tomto případě není myšlen segmentovaný shluk, který představuje nosič neporostlý biofilmem, ale celkovou plochu, kterou na snímku zabírá reziduum, nosič neobsazený a plocha s nárůstem biofilmu. Plochu nosiče získáme úpravou jasu vstupního obrazu s využitím jasové 'L*' složky následované morfologickou operací otevření, kterou dojde k zaplnění mezer, kde se vyskytuje odumřelý biofilm, který má téměř černou barvu, a tudíž splývá s pozadím snímku.



Obr. 12.9 Vizualizace pro výpočet pozadí

Po výpočtu plochy nosiče ve snímku se vypočtou zaplnění jednotlivými druhy biofilmu a pro korektnost také celkové zaplnění biofilmem. Pro dosažení korekce z plošného vyjádření na prostorové bylo snahou vyjádřit koeficienty, které by charakterizovaly vyprahované odstíny (druhy) biofilmu jako vyjádření mohutnosti vrstvy nárůstu biofilmu. Byly vypočteny tyto koeficienty vyjadřující objemový efekt (Obr. 12.10, koeficienty $y_1 = 0,6$, $y_2 = 0,2$, $y_3 = 0,7$).

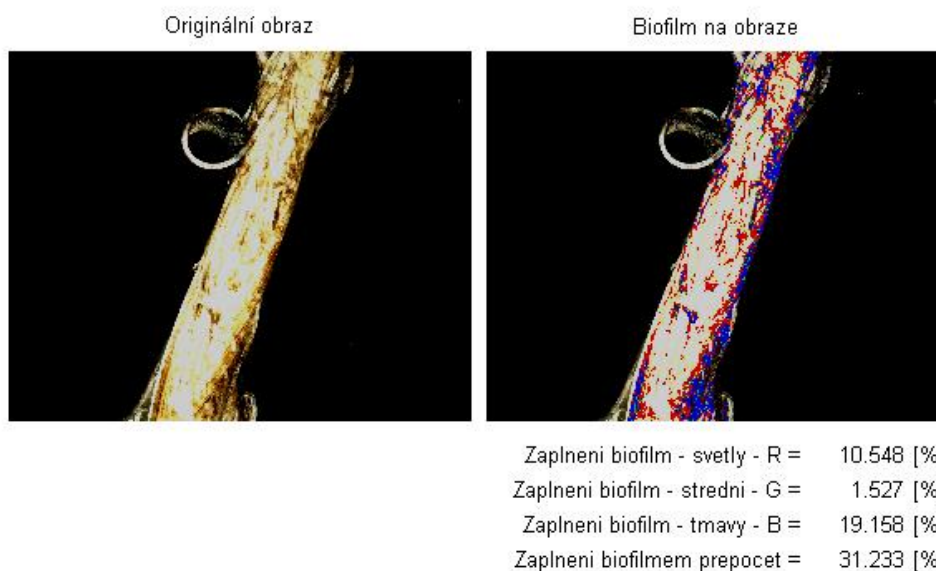


Obr. 12.10 Vyjádření objemového efektu a označení koeficientů tloušťky [40]

Koeficienty byly vypočteny z výsledků prvotního hodnocení snímků bez přepočtových koeficientů, tedy hodnocení s výpočtem plošného zaplnění pro dané vyprahované odstíny biofilmu. Pro jednotlivé vyhodnocené snímky nosičů z dnů, ve kterých bylo souběžně s odběrem prováděno stanovení sušiny, jsou plošná zaplnění jednotlivých druhů biofilmu (v procentech) převedena na poměrové hodnoty, které vyjadřují vzájemné poměrové vztahy mezi jednotlivými odstíny biofilmu. Z těchto

poměrových vztahů byly následně sestaveny soustavy rovnic, k nimž byly vztaženy příslušné hodnoty sušiny. Cílem korelace je se pokusit takovýmto způsobem naznačit souvislost mezi plošným a prostorovým nárůstem biofilmu. Tato chyba, jak již bylo řečeno, vzniká nemožností užít mikroskopické snímání ve vrstvě (osy z). Korelace je založena na poznatku, že čím tmavší je biofilm na snímku, tím je větší jeho množství (mohutnost), protože narůstá ve vrstvách. Přepočtové koeficienty lze samozřejmě v programu okamžitě změnit, nebo je zcela vynechat. Existuje tak možnost užít program pro výpočet reálného plošného zaplnění nosiče biofilmem ze vstupního snímku.

Poslední částí programu je barevné zobrazení jednotlivých odstínů biofilmu do vstupního obrazu, výpis hodnot objemu zaplnění snímku druhy biofilmu, zápis dat do Excelu a vytvoření porovnávacího listu, který obsahuje snímek před a po vyhodnocení (Obr. 12.11).



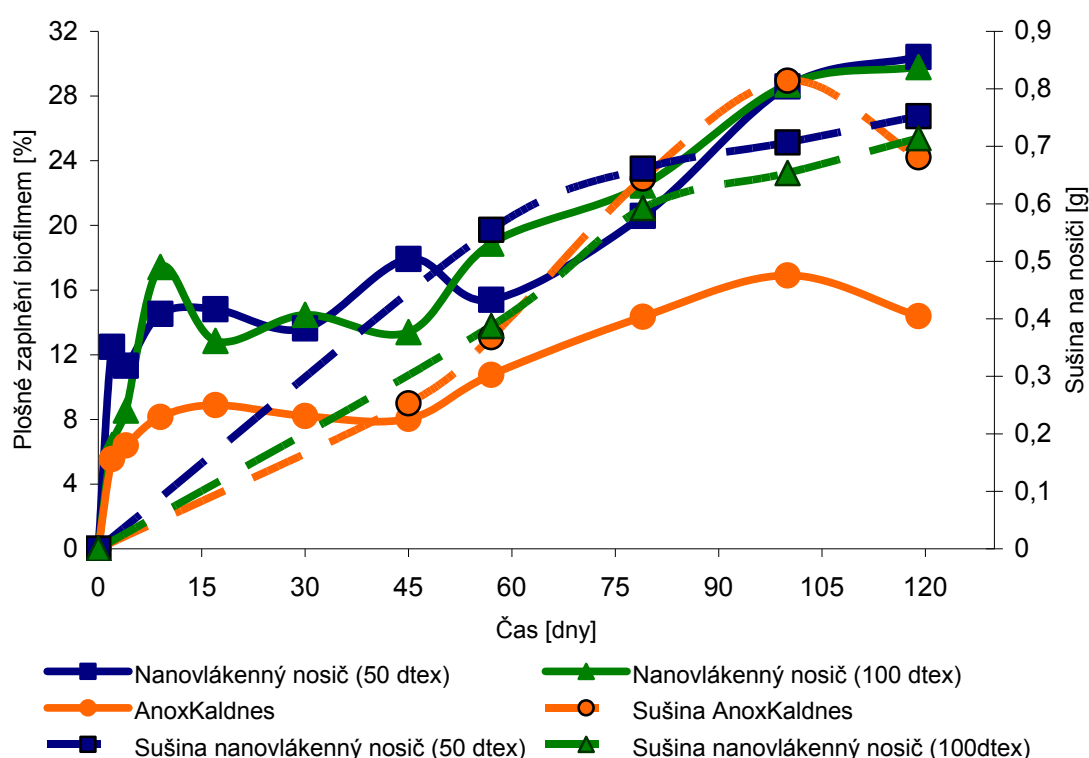
Obr. 12.11 a) Obraz původního nosiče s biofilmem b) Detekovaný biofilm, kde „red” = „světlý biofilm”, „green” = „střední biofilm”, „blue” = „tmavý biofilm”

12.6 Obrazové hodnocení 2D parametrů

Z mikroskopických snímků nosičů byly vytvořeným programovým kódem separovány shluky ploch reprezentující biofilm na snímku. Posléze byly tyto snímky s biofilmem vyhodnoceny již existujícím programovým kódem. Vyhodnocovány byly tyto 2D charakteristiky: počet objektů ve snímku, plošná porozita biofilmu, maximální difuzní vzdálenost a běhové délky (horizontální a vertikální).

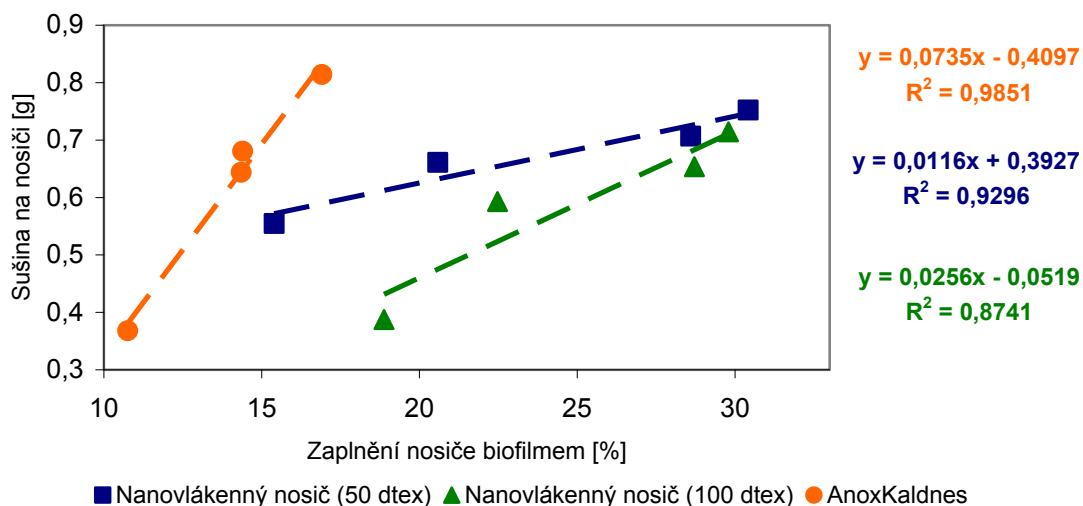
12.7 Výsledky obrazového hodnocení

Výsledná kinetika růstu biofilmu na nosičích vyhodnocená obrazovou analýzou je korelována se stanovením sušiny. V grafu níže (Obr. 12.12) je znázorněn průběh nárůstu biofilmu na dvou typech nanovláknenného nosiče (50 dtex a 100 dtex) a na jednom typu komerčního nosiče (AnoxKaldnes), které byly získány pomocí výše zmíněné obrazové analýzy. Současně je v grafu uvedena sušina (znázorněna čárkovaně). Trend nárůstu sušiny v období 50. – 125. den koresponduje s nárůstem zaplnění nosiče biofilmem (obrazové hodnocení).



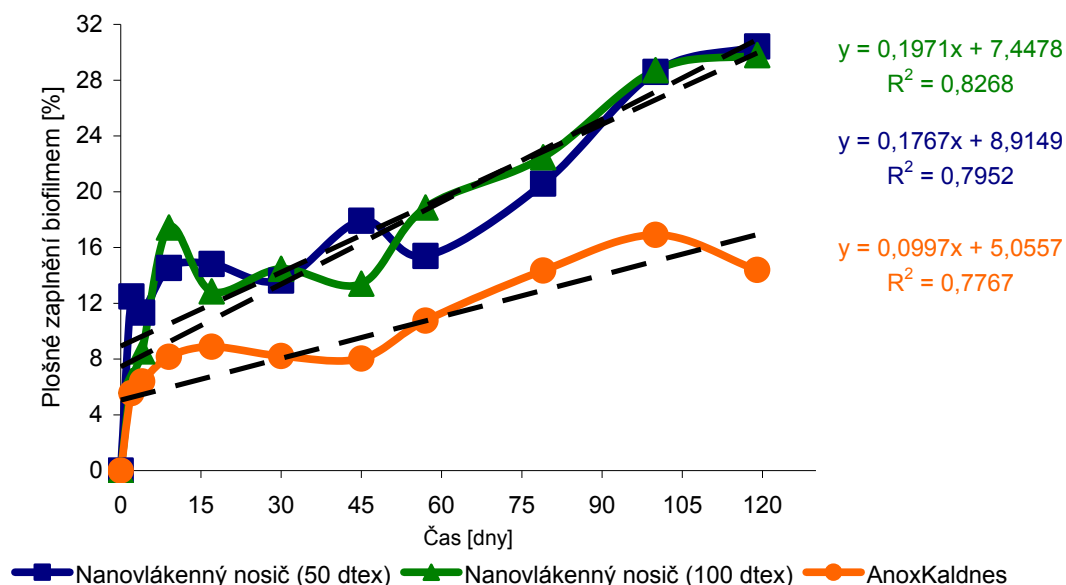
Obr. 12.12 Časový průběh nárůstu biofilmu

Vhodnější pohled na korelaci sušiny a obrazové analýzy získáme z grafu níže (Obr. 12.13), ve kterém jsou oba parametry (sušina a obrazová analýza) vyjádřeny společně. Parametry R^2 určují míru shody (přímé závislosti mezi parametry). V našem případě se tedy podařilo dosáhnout korelace mezi sušinou a vypočteným plošným zaplněním biofilmu obrazovou analýzou tak, že se shoda pohybuje od 87 % do 98 %.



Obr. 12.13 Korelace mezi parametry sušiny a plošného zaplnění biofilmem

Výsledkem obrazové analýzy pomocí vytvořeného programového kódu pro měření zaplnění biofilmem je vyjádření kinetiky růstu mikroorganismů na užitých nosičích. V grafu níže (Obr. 12.14) tak vidíme vývoj nárůstu biofilmu na nosiči s narůstajícím časem kultivace. Je zřetelné, že mikroorganismy na nanovláknenných nosičích mají vyšší míru kolonizace, a tudíž i rychlejší kinetiku růstu než na komerčním nosiči. Nanovláknna mají především velký měrný povrch a také specifickou charakteristiku (vysokou pórovitost a malé rozměry pórů). Mikroorganismy se na nanovláknna mohou přichycovat přímo, protože nemusí narušovat povrch nosiče. Kultivace komerčního nosiče AnoxKaldnes probíhá pomaleji, to je nejspíše způsobeno jeho charakteristikou a morfologií povrchu. Mikroorganismy jsou nuceny nejprve narušovat jeho povrch, než se mohou přichytit a tvořit kompaktní biofilm.

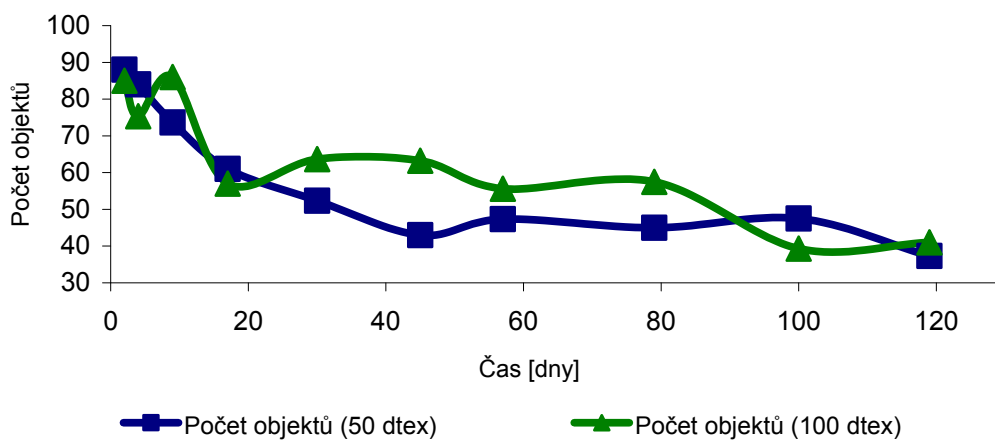


Obr. 12.14 Kinetika růstu mikroorganismů na nosičích

12.8 Výsledky obrazového hodnocení 2D parametrů

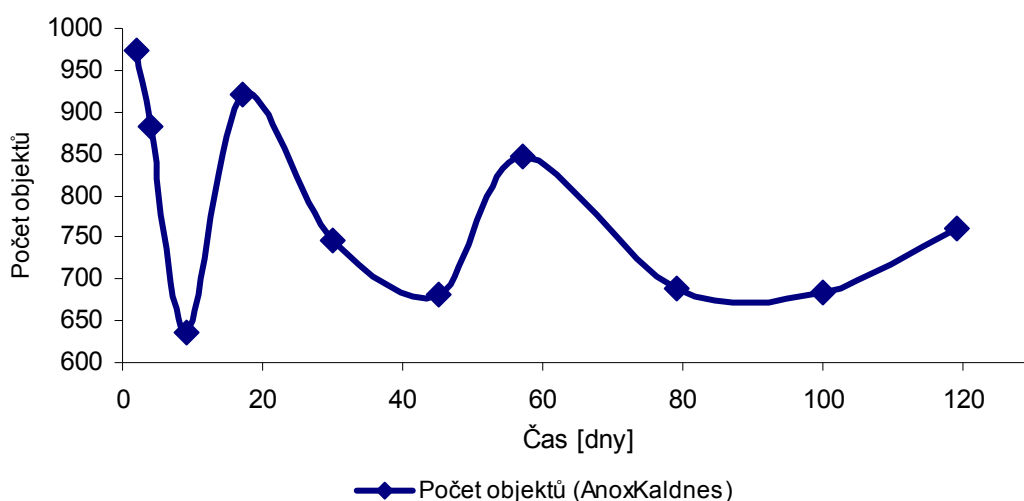
12.8.1 Počet objektů

Užití nanovláken pro výrobu nosiče biomasy umožňuje mikroorganismům tvorbu kompaktních ploch na jeho povrchu. Z toho je zřejmé, že počet objektů lokalizovaných na nanovláknenných nosičích bude v průběhu času kultivace klesat (Obr. 12.15), menší útvary biofilmu se spojují a začínají tvořit vyšší celky, které v závěru experimentu pokrývají téměř celý povrch nosiče. Biofilm se tudíž rozrůstá i na místa bez nanovláken.



Obr. 12.15 Počet objektů na nanovláknenném nosiči

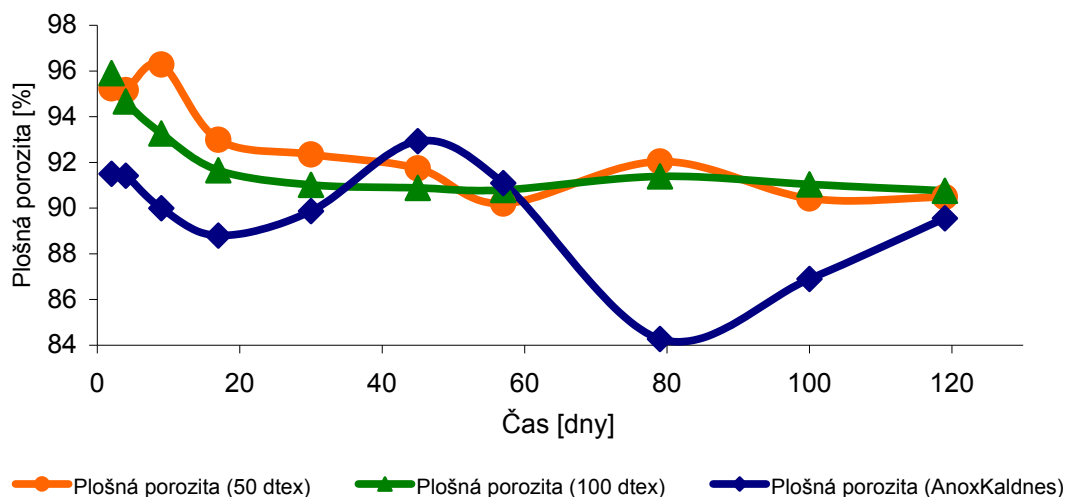
Na komerčním nosiči AnoxKaldnes se v důsledku jeho specifické morfologie tvoří velké množství malých kolonií. A to proto, že mikroorganismy musí nejprve narušovat povrch nosiče, než se mohou přichytit. U nosiče AnoxKaldnes se při určování charakteristik vyskytují skokové výkyvy, které jsou nejspíše způsobeny nestálými podmínkami v reaktoru (např. výkyvy teploty, objemového zatížení), a také z důvodu nerovnoměrného osidlování povrchu nosiče bakteriální populací. Mikroorganismy mají větší adhezi k solným krystalům, které se na nosiči tvoří hned na počátku kultivace než k jeho povrchu.



Obr. 12.16 Počet objektů na nosiči AnoxKaldnes

12.8.2 Plošná porozita

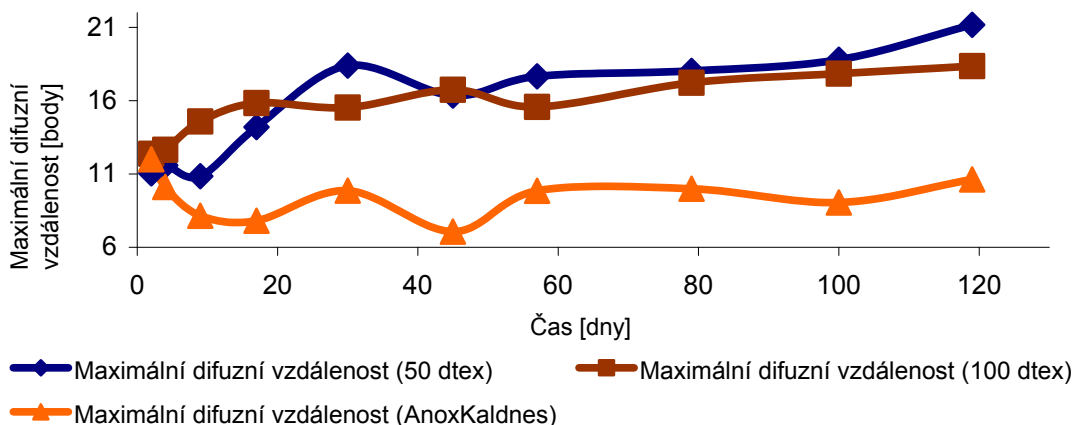
Plošná porozita je v tomto případě poměrem plochy, kterou na snímku **zabírá biofilm, vůči celé ploše snímku**. Klesající počet objektů u nanovláken koreluje se snižováním hodnoty plošné porozity, která reprezentuje obsazování volného prostoru nosiče bakteriální populací ve formě biofilmu (porozita ~ neobsazený prostor nosiče). Zmíněné výkyvy se při hodnocení plošné porozity projeví u nosiče AnoxKaldnes (Obr. 12.17).



Obr. 12.17 Plošná porozita nosičů

12.8.3 Difuzní vzdálenost

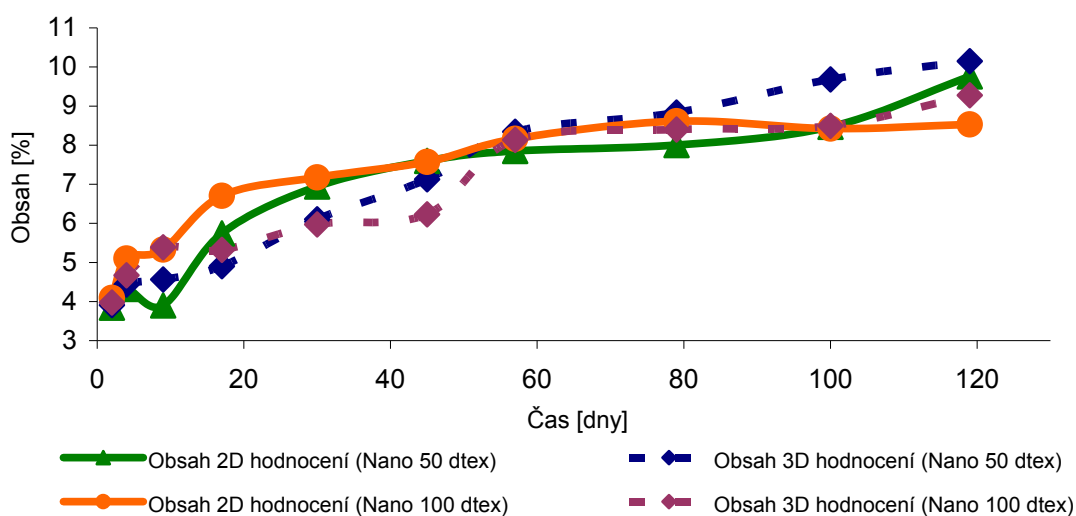
Difuzní vzdálenost je v hodnocení **2D charakteristik** ukazatelem vzdálenosti, kterou musí substrát (resp. rozpuštěný kyslík) z okraje kolonie urazit do středu shluku buněk (viz 4.6.3). Pro nanovláknenné nosiče klesá počet objektů, tvoří se větší a kompaktnější shluky a maximální difuzní vzdálenost roste. Nosiče AnoxKaldnes mají opačnou tendenci (nejspíše vlivem výkyvů charakteristik v provozu reaktoru, objemového zatížení a charakteristické morfologie nosiče). Z těchto důvodů se tvoří velké množství malých kolonií, tudíž maximální difuzní vzdálenost výrazně nenarůstá. Hodnoty vykreslené v grafu níže (Obr. 12.18) jsou průměrem naměřených hodnot maximální difuzivity všech objektů nosiče na snímku.



Obr. 12.18 Maximální difuzní vzdálenost

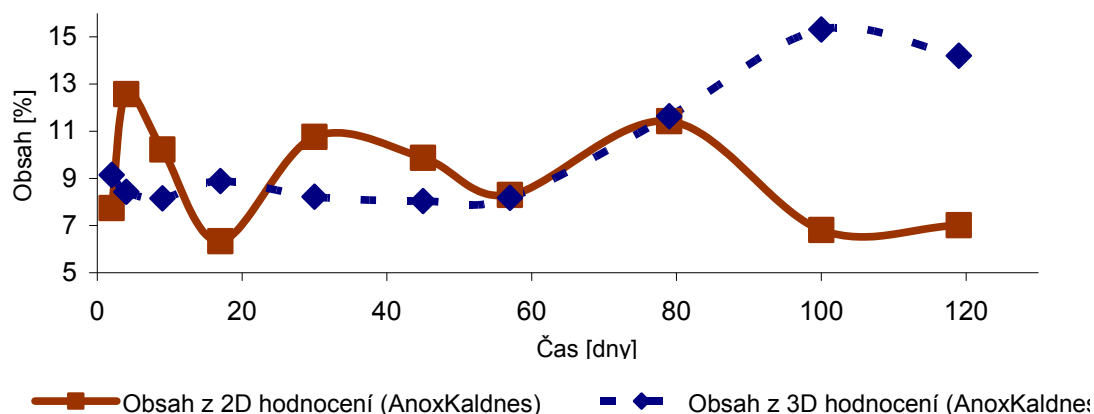
12.8.4 Obsah

Při 2D hodnocení byly pro nalezené objekty vypočteny jejich obsahy. Sumou byl získán celkový obsah plochy biofilmu na snímku, který byl porovnán s vypočtenými hodnotami o zaplnění biofilmem z předešlého hodnocení (z 3D hodnocení). Samozřejmě pro 2D hodnocení se neuvažují přepočtové koeficienty pro prostorové zaplnění. Tím jsme získali porovnání mezi oběma způsoby výpočtu. Z grafu uvedeného níže (Obr. 12.19), který vyjadřuje **procentuálně podíl obsahu biofilmu k celé ploše snímku**, lze konstatovat, že oba programové prostředky dosáhly obdobných vypočtených hodnot.



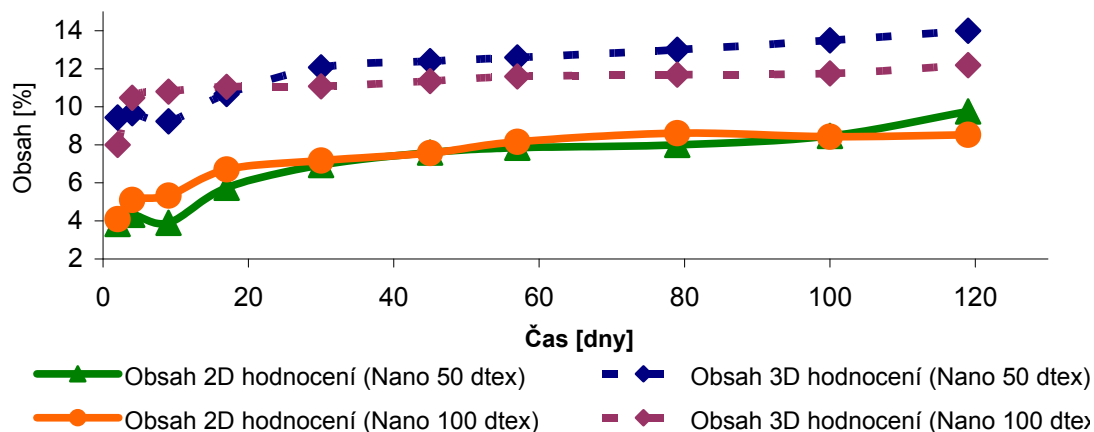
Obr. 12.19 Obsah biofilmu na nanovláknenném nosiči (3D hodnocení bez přepočtových koeficientů)

Pro nosič AnoxKaldnes je jednoznačně efektivnější výpočet obsahu segmentací barev ve snímku, tedy využitím nově vytvořeného programového kódu. Výpočet obsahu ve 2D pomocí obsazené plochy všech objektů ve snímku je zatížen především změnami stavu reaktoru (změny v objemovém zatížení, teploty, průtoku aj.). Z těchto důvodů dochází u AnoxKaldnes k nerovnoměrnému osídlení (bakteriální populace ne/roste v čase rovnoměrně a určit její kinetiku pomocí této metody je komplikované).

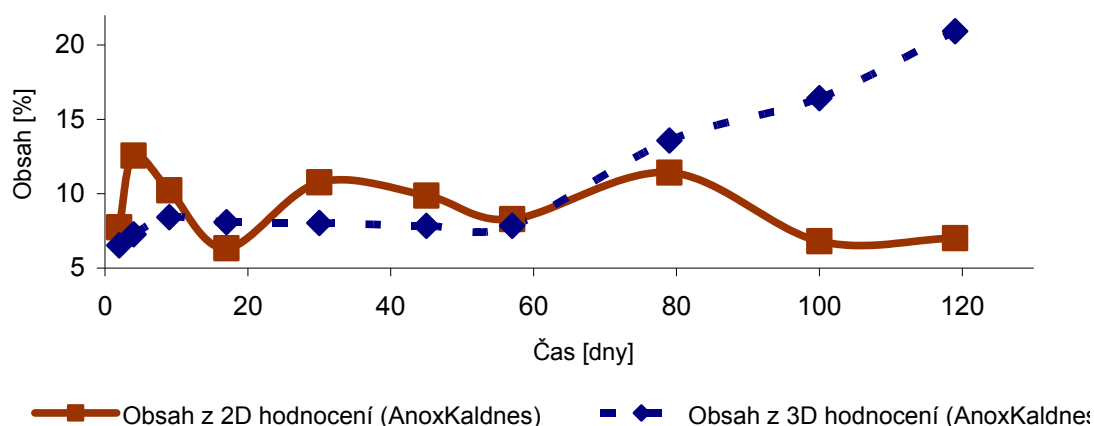


Obr. 12.20 Obsah biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (3D hodnocení bez přepočtových koeficientů)

Porovnání obsahu plochy biofilmu ve 2D s přepočtem obsahu biofilmu na prostorové zaplnění (3D) (pro nanovláknenný nosič a nosič AnoxKaldnes) je uvedeno v grafech níže (Obr. 12.21 a Obr. 12.22). Z grafů je patrné, jak velké množství biofilmu je zanedbáváno, pokud hodnotíme pouze plošný nárůst biofilmu na nosiči.



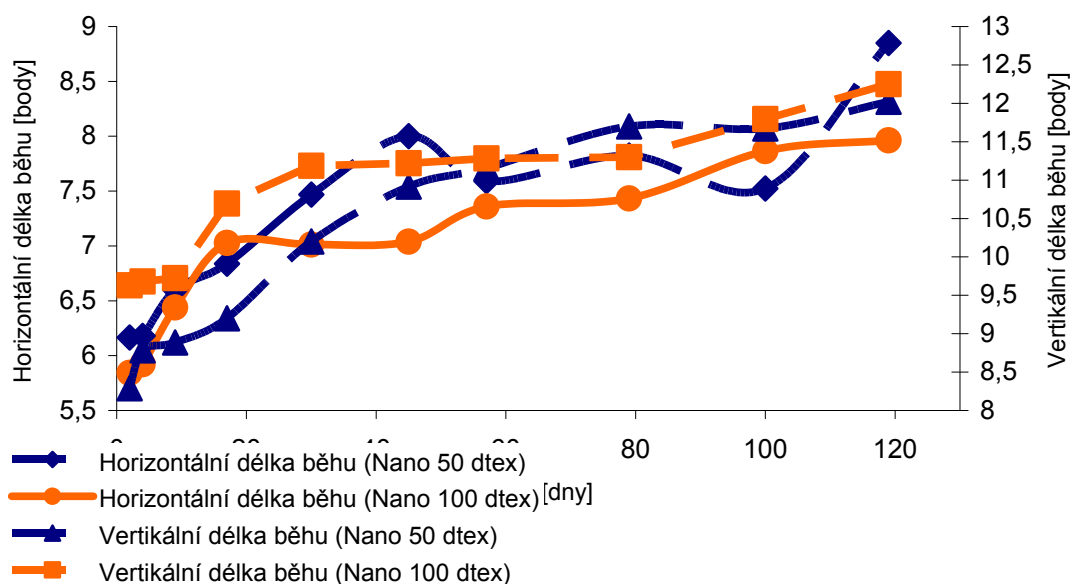
Obr. 12.21 Obsah biofilmu na nanovláknenném nosiči (3D hodnocení s přepočtovými koeficienty)



Obr. 12.22 Obsah biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (3D hodnocení s přepočtovými koeficienty)

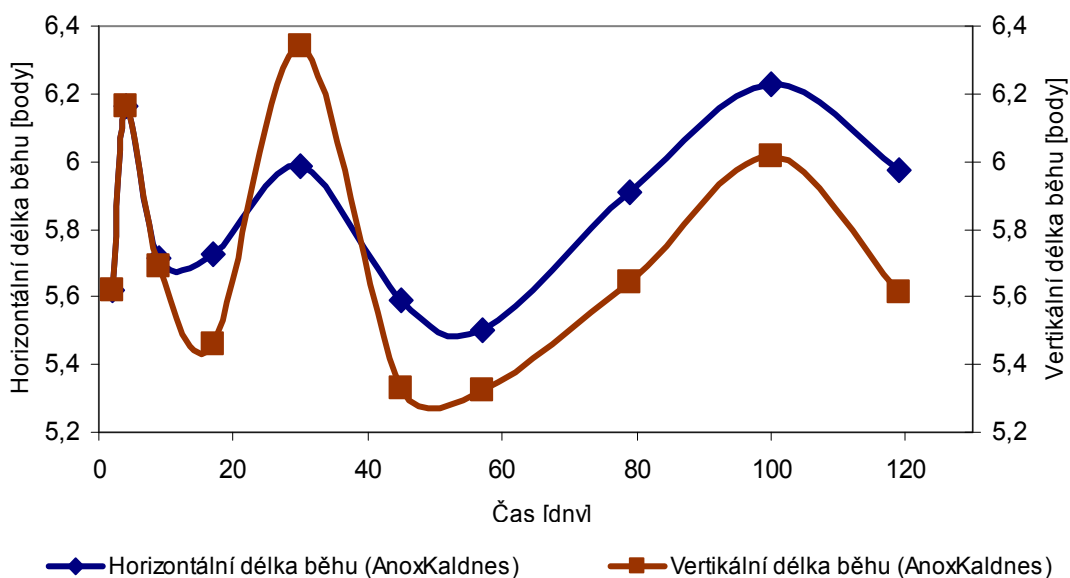
12.8.5 Běhové délky

Běhová délka reprezentuje rozměry shluku v horizontálním a vertikálním směru, užívá se nejčastěji při určování „preferenčního“ růstu bakteriální populace na nosiči. U nanovláknenných nosičů dochází k růstu horizontální i vertikální běhové délky společně, tudíž růst biofilmu na nosiči je homogenně rozprostřen do všech směrů (růst je téměř lineární, nedochází ke směrovosti růstu biofilmu na nosiči). Hodnoty vynesené v grafech níže reprezentují průměr běhových délek (horizontální a vertikální) všech objektů lokalizovaných na snímcích (Obr. 12.23 a Obr. 12.24).



Obr. 12.23 Běhové délky objektů na nanovláknenném nosiči

Určení běhových délek u nosiče AnoxKaldnes je zatíženo již zmíněnými nestálostmi v podmínkách provozování reaktorů. Nejvíce je ovlivněno skokovými změnami počtu objektů, netvoří se velké plochy zaplnění, ale velký počet malých kolonií, tudíž dochází k velkým změnám běhových délek (Obr. 12.24). Detailnější vyhodnocení 2D charakteristik bude následovat v dalších pracích a dalších navazujících experimentech.



Obr. 12.24 Běhové délky objektů na nosiči AnoxKaldnes

Závěr

Účelem práce bylo ověřit schopnosti biodegradace odpadních vod znečištěných fenoly pomocí laboratorních experimentů (doba zdržení odpadní vody, maximální objemové zatížení). Parametry a sestavení laboratorních experimentů byly předem známy: druh odpadní vody, míra plnění reaktorů, druh a velikost použitého nosiče. Sledována byla chemická stránka kontinuálního provozu formou měření hodnot CHSK a obsahu fenolů v reaktorech, které ukazují, zda a jakých limitů bylo dosaženo reaktorem s daným typem nosiče na jeho výstupu. Chemické analýzy zahrnovaly měření pH, rozpuštěného kyslíku, konduktivity a reflektovaly parametry prostředí v reaktorech. Z mikrobiologického hlediska se prováděly běžné analýzy hodnocení bakteriálního růstu a také respirační testy.

Pro nalezení limitních stavů reaktorů: doba zdržení, koncentrace kontaminantů (objemové zatížení), byly provozovány laboratorní experimenty biofilmových reaktorů s komerčním (AnoxKaldnes) a nově vyvinutým nanovlákným nosičem. Nalezení limitních stavů umožňuje optimalizaci stávající technologie čištění se zaměřením na fenolem znečištěné vody. Provoz modelů ukázal efektivní možnost čištění takovýchto odpadních vod pomocí reaktorů s nosičem vyrobeným pomocí nanotechnologií, konkrétně nosné nitě s nánosem nanovlákn.

Byly nalezeny tyto limitní stavy reaktorů:

- Maximální CHSK vstupní vody 6550 mg/l;
- Minimální doba zdržení 4,29 dne;
- Maximální objemové zatížení reaktorů 4585 mg/l/den;
- Reaktor s AnoxKaldnes: při maximálním objemovém zatížení CHSK 665 mg/l, celkové fenoly 160 mg/l;
- Reaktor s nanovláknem: při maximálním objemovém zatížení CHSK 637,5 mg/l, celkové fenoly 27,2 mg/l.

Z provozu laboratorních modelů lze vyvodit následující závěry. Pomocí obou nosičů je možné provádět biologické čištění odpadních vod znečištěných fenolem. Nanovlákná jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu. Nanovlákný nosič dosahuje mírně lepších hodnot celkového zatížení organického znečištění na odtoku, neovlivňuje negativně podmínky v reaktoru, má lepší schopnost odolávat významnějším oscilacím v kvalitě odpadních vod, tím je možné předcházet opakovanému zapracování

bioreaktoru. Jeho počáteční zapracování je rychlejší především díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu. Z respiračních testů je zřejmé, že reaktor s nanovláknými nosiči dosahuje vyšších hodnot aktivity mikroorganismů. Nanotechnologie je v kombinaci s biologickými metodami vhodná pro biodegradaci odpadních vod.

Dalším cílem práce bylo sledování vývoje biofilmu běžnými a moderními metodami. Běžnými metodami byly v případě volně dispergovaných mikroorganismů v reaktorech optická denzita, v případě mikroorganismů vázaných na nosičích gravimetrické metody, konkrétně stanovení biomasy na nosiči. Novou, moderní metodou byla obrazová analýza. Došlo k nahrazení dříve užívaného programového kódu nově vytvořeným. Starý programový kód byl založen na prahování, hodnotil jen plošné zaplnění. Biofilm nenarůstá jen plošně, ale také prostorově, proto jsme se pokusili o korelaci dat z obrazové analýzy (plošné zaplnění) jednotlivých nosičů s příslušnými výsledky gravimetrických stanovení sušiny a naznačit tak míru prostorového zaplnění. Nový programový kód je založen na segmentaci barev a umožňuje hodnocení prostorového zaplnění.

Z užití běžných a moderních metod hodnocení biofilmu lze vyvodit následující závěry. Reaktor s nanovlákným nosičem dosahoval nižších hodnoty absorbance než v případě komerčního nosiče AnoxKaldnes. Na komerčním a nanovlákném nosiči se nacházelo téměř shodné množství biomasy, rychlost kolonizace mikroorganismů však byla značně vyšší na nanovlákném nosiči. Nanovlákný nosič dosahuje při hodnocení obrazovou analýzou vyšších hodnot plošného a prostorového zaplnění. Pomocí obrazové analýzy došlo k zachycení kinetiky růstu bakteriální populace po celou dobu její kultivace v reaktorech. Ze dvou užitých druhů nanovlákného nosiče s různými nánosy nanovláknů dosahuje mírně lepších výsledků nanovlákný nosič s nánosem 50 dtex.

Shrnutí přínosů obrazové analýzy:

- Plošné zaplnění nosiče koreluje se stanovením sušiny v prvních fázích kolonizace, kdy je mohutnost biofilmu malá.
- Použití obrazové analýzy (plošné zaplnění) je nejvhodnější pro hodnocení počátečních fází kolonizace a pro pomalu rostoucí bakteriální populace.
- Prostorové zaplnění nosiče koreluje se stanovením sušiny i v pozdějších fázích kolonizace.

- Výpočet pomocí prostorového zaplnění nosiče je použitelný i pro hodnocení pozdějších fází kolonizace a hodnocení rychle rostoucích bakteriálních populací.

Námět pro další rozvoj této práce je nastíněn dále. Otázkou užití nanovláken je jejich dezintegrace a následná možná toxicita pro vyšší organismy (resp. bioakumulace). Mikroskopické snímání a obrazová analýza biofilmu má některá úskalí. Pro mikroskopické snímání je vhodné nalézt vyvážené nastavení snímací aparatury, abychom předešli velké světlosti snímků, která stěžuje jejich obrazovou analýzu. Optické hodnocení plošného zaplnění platí jen pro tenké vrstvy biofilmu, postupem času, jak se mikroorganismy množí a biofilm dosahuje větší mohutnosti, je pro hodnocení biofilmu vhodné užít gravimetrické metody, nebo mikroskopu s měřením v ose z. Další využití obrazové analýzy v laboratorních experimentech je plánováno pro: testování stability a dezintegrace nanovláčenné vrstvy barvením polyuretanové vrstvy, určení vlivu mikroorganismů na stav nosiče.

Literatura

- [1] HLAVÁČ, M., ŠONKA, V., Počítačové vidění. 1st ed. Praha: Grada, 1992. 250 p. ISBN 80-85424-67-3.
- [2] WU, Q., MERCHANT, F., CASTLEMAN, K., Microscope image processing. 1st ed. Academic Press, 2008. 548 p. ISBN 978-0-12-372578-3.
- [3] Základní metody světelné mikroskopie. Brno: Optoteam, s.r.o., Nikon, 2004. 66 s.
- [4] LEWANDOWSKI, Z., BEYENAL, H., Fundamentals of biofilm research. 1st ed. CRC Press, 2007. 480 p. ISBN 978-0849335419.
- [5] O'GORMAN, L., SAMMON, M., SEUL, M., Practical Algorithms for Image Analysis : Description, Examples, Programs, and Projects. Cambridge University Press, 2008. 349 p. ISBN 9780521884112.
- [6] Transgalactic Ltd. What Is Biofilm? [online]. 14.1.2010 [cit. 2011-09-28]. Automation in Microbiology and Biosciences. Dostupné z WWW: <http://www.bionewsonline.com/n/what_is_biofilm.htm>.
- [7] SCHINDLER, J. Ze života bakterií. 1.st ed. Praha: Academia, 2008. 143 p. ISBN 978-80-200-1666-9.
- [8] Center for Biofilm Engineering: Biofilm research & education relevant to industry, health, and the environment | Center for Biofilm Engineering [online]. 2008 [cit. 2011-09-28]. Biofilm basics | Center for Biofilm Engineering. Dostupné z WWW: <<http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics.html>>.
- [9] *Aktivovaný kal*: studijní text z předmětu Aplikovaná hydrobiologie UP Olomouc. Katedra ekologie a životního prostředí. Dostupné z WWW: <<http://ekologie.upol.cz/ku/ahdo/Aktivovan%fd%20kal.doc>>.
- [10] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. Biologické čištění odpadních vod. From Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2011-09-28]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B022>
- [11] Vodní zdroje Ekomonitor spol. s r.o. Biologické čištění vod | www.cisticka-odpadnich-vod.eu [online]. 2009 [cit. 2011-09-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.cisticka-odpadnich-vod.eu/otazky-a-odpovedi/biologicke-cisteni-vod>>.
- [12] *Člověk a odpadní voda - II. část*: učební text Člověk a odpady. ČZU Praha, Technická fakulta. Dostupné z WWW: <http://www3.czu.cz/php/skripta/kapitola.php?titul_key=64&idkapitola=131>.

- [13] RYCHTERA, M. *Fermentační technologie*: sylabus z předmětu Potravinářská technologie a biotechnologie. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/potravtech.pdf>>.
- [14] *Kultivační techniky*: sylabus k předmětu. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/kultivtech.pdf>>.
- [15] YANG, X., BEYENAL, H., HARKIN, G., LEWANDOWSKI, Z., Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, vol. 39, no. 2, p. 109–119. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701299000974>>. DOI: 10.1016/S0167-7012(99)00097-4.
- [16] AnoxKaldnes. AnoxKaldnes™ MBBR biofilm technology [online]. 2011 [cit. 2011-10-14]. AnoxKaldnes™ MBBR biofilm technology. Dostupné z WWW: <<http://www.anoxkaldnes.com/Eng/c1prodc1/mbbr.htm>>.
- [17] Veolia Water Solutions & Technologies. Veolia Water Solutions & Technologies [online]. 2011 [cit. 2011-12-18]. AnoxKaldnes™ MBBR - Použití. Dostupné z WWW: <<http://www.veoliawaterst.com/mbbr/cz/applications.htm>>.
- [18] KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER, T., *Využití nanovláknenných nosičů při biologickém čištění podzemních vod znečištěných fenoly*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi IV, Třeboň, 17. - 19. 10. 2011. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 42-48. ISBN 978-80-86832-61-6.
- [19] CARVALHO, C., FONSECA, M., The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, vol. 67, no. 6, p. 715–726. Dostupné z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/2xdh2td35bc8kjk5/fulltext.pdf>>. DOI: 10.1007/s00253-005-1932-3.
- [20] DOHÁNYOS, M., KOLLER, J., STRNADOVÁ, N., Čištění odpadních vod. 2.nd ed. Praha: VŠCHT, 2007. 177 p. ISBN 978-80-7080-619-7.
- [21] GALI, V., PRADEEP, K., MEHROTRA, I., Biodegradation of Phenol with Wastewater as a Cosubstrate in Upflow Anaerobic Sludge Blanket. *Journal of Environmental Engineering*, 2006, vol. 132, p. 1539. Dostupné z WWW: <<http://www.aseanenvironment.info/Abstract/41016025.pdf>>.
- [22] SOROUR, M., ABDELRASOUL, F., IBRAHIM, W., Phenolic wastewater treatment. In IWTC10 2006: Tenth International Water Technology Conference. Alexandria, Egypt, 2006, Dostupné z WWW:

- <<http://water-observatory.net/sources/iwtc2006/14-6.PDF>>.
- [23] Bezpečnostní list – *Fenol pro analýzu*. Dostupné z WWW: <<http://www.kch.tul.cz/filebrowser/download/9389020>>.
- [24] CHUDOBA, J., DOHÁNYOS, M., WANNER, J., Biologické čištění odpadních vod. 1st ed. Praha: STNL, 1991. 468 p. ISBN 80-03-00611-2.
- [25] Informační leták ke kyvetovým testům Hach Lange
- [26] WTW. Katalog Měřicí technika pro laboratoře a životní prostředí 2011. Dostupné z WWW: <<http://www.wtwcz.com/index.php?s=3>>.
- [27] *Biodegradace a biodeteriorace*: sylabus k předmětu Základy biodegradace a biodeteriorace. VŠCHT Praha, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství. Dostupné z WWW: <http://eso.vscht.cz/cache_data/1175/www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/biodegbiodeg.pdf>.
- [28] HORÁKOVÁ, D. Bioremeriace [online]. 1.st ed. Brno: Masarykova univerzita, 2007 [cit. 2011-12-14]. Dostupné z: <<http://is.muni.cz/elportal/?id=710435>>. ISBN 1802-128X.
- [29] REJMAN, M. *Určení technologických parametrů fluidního bioreaktoru s využitím „nanobambulí“ jako nosiče biomasy: diplomová práce*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009. 82 p.
- [30] *Růst mikroorganismů a jeho sledování – stanovení biomasy mikroorganismů*: studijní materiály k předmětu Obecná mikrobiologie. Univerzita Tomáše Bati Zlín, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Dostupné z WWW: <uiozp.ft.utb.cz/studmat/2008912145649/Úloha7.doc>.
- [31] *Rozbor suspenze technologického kalu. Gravimetrické stanovení rozpuštěných a nerozpuštěných látek, sušina, ztráta žiháním*: návody na laboratorní cvičení z předmětu Technologie vody. Univerzita Tomáše Bati Zlín, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Dostupné z WWW: <<http://uiozp.ft.utb.cz/studmat/2010920144152/T7TVO042010.pdf>>.
- [32] CHITADE, A. Colour based image segmentation using K-Means Clustering. International Journal of Engineering Science and Technology, 2010, vol. 2, no. 10, p. 5319–5325. Dostupné z WWW: <<http://www.ijest.info/docs/IJEST10-02-10-117.pdf>>.
- [33] Adobe Systems Incorporated. [online]. [cit. 2011-25-11]. Návod pro Adobe Photoshop CS. Dostupné z WWW: <<http://www.sps-ub.cz/projekty/2005/merka1/helpp/help.html>>.

- [34] *Cie L*a*b Color Scale*: studijní text Color theory. Hunter Associates Laboratory, Reston. Dostupné z WWW:
<http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf>.
- [35] ZMEŠKAL, O., ČEPPAN, M., Dzik P., *Barevné prostory a správa barev*, XXIV. International Symposium of Phototechnic, Komora fotografů ČR, Rožnov pod Radhoštěm, 20. - 22., 2002. Dostupné z WWW:
<http://www.fch.vutbr.cz/lectures/imagesci/download/stud06_rozn02.pdf>.
- [36] Grafika Publishing s.r.o. . FOTOGRAFOVANI - Vše o světle - [online]. 2007 [cit. 2011-11-15]. 5. Barevné modely. Dostupné z WWW:
<http://www.fotografovani.cz/art/fozak_df/rom_1_05_colormodels.html?tisk=on>.
- [37] MathWorks. MathWorks - MATLAB and Simulink for Technical Computing [online]. 2011 [cit. 2011-11-15]. K-Means Clustering - MATLAB & Simulink Example. Dostupné z WWW: <www.mathworks.com/help/toolbox/stats/bq_679x-18.html#bq_679x-19>.
- [38] MOORE, A., *K-Means and Hierarchical Clustering*: prezentace. School of Computer Science. Carnegie Mellon University. Dostupné z WWW:
<<http://www.autonlab.org/tutorials/kmeans11.pdf>>.
- [39] PELLEG, D., , MOORE, A., *X-means: Extending K-Means with Efficient Estimation of the Number of Clusters*, Proceedings of the Seventeenth International Conference on Machine Learning, 29. 6. – 2. 7. 2000. p.727-734. Dostupné z WWW:
<<http://www.cs.cmu.edu/~dpelleg/download/xmeans.pdf>>.
- [40] KŘÍKLAVOVÁ, L., DUB, T., *Hodnocení míry kolonizace na nosiči biomasy využitím obrazové analýzy*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi IV, Třeboň, 17. - 19. 10. 2011. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 156-159. ISBN 978-80-86832-61-6.
- [41] *Návod k obsluze mikroskopu Olympus BX51M*
- [42] Olympus Česká republika [online]. 11.2.2010 [cit. 2010-05-02]. Hlavní funkce pro BX51/BX51M. Dostupné z WWW:
<http://www.olympus.cz/microscopy/26_BX51_BX51M_Key_Features.htm>.
- [43] Olympus Česká republika [online]. 23.3.2010 [cit. 2010-05-02]. Specifikace pro E-510. Dostupné z WWW:
<http://www.olympus.cz/consumer/dslr_E-510_Specifications.htm>.
- [44] Digitální fotoaparát E-510 Návod k použití; 2007.

- [45] QuickPHOTO MICRO 2.3, Uživatelská příručka.
- [46] PROMICRA - Kompletní řešení pro digitální mikrofotografii [online]. 2008 [cit. 2010-05-02]. PROMICRA - Produkty - QuickPHOTO. Dostupné z WWW:
<<http://www.promicra.cz/produkty-quickphoto-micro.php>>.
- [47] PROMICRA - Kompletní řešení pro digitální mikrofotografii [online]. 2008 [cit. 2010-05-02]. PROMICRA - Produkty- Deep Focus. Dostupné z WWW:
<<http://www.promicra.cz/produkty-deepfocusmodul.php>>.
- [48] DUB, T. *Optimalizace metod snímání obrazu pro následné obrazové hodnocení: semestrální projekt*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2010.
- [49] BJORN, R., BJOMAR, E., ULGENES, Y., Lygren, E., Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural Engineering*, 2006, vol. 34, p. 322–331. Dostupné z WWW:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860905000531>>.

Přílohy

Struktura DVD

- ELEKTRONICKÁ VERZE DIPLOMOVÉ PRÁCE
- Složka Program – vytvořený programový kód v Matlabu pro vyhodnocování snímků
 - Kmeans_hodnoceni_biofilmu_nanovlakna – hodnocení snímků nanovláknenných nosičů
 - Kmeans_hodnoceni_biofilmu_anoxkaldnes – hodnocení snímků nosičů AnoxKaldnes
- Složka Snímky
 - Složka Hodnocení snímků plošné (2D parametry) – vstupní a vyhodnocené snímky biofilmu
 - Složka Hodnocení snímků prostorové (3D) – vstupní mikroskopické snímky nosičů a snímky vyhodnocené vytvořeným kódem (prostorové hodnocení)
- Záloha příloh v zip formátu (zaloha.zip)